

**Seroepidemiologische Untersuchungen
zur Verbreitung Shigatoxin
(Stx)2e-bildender *Escherichia coli*
in hessischen Schweinezuchtbeständen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

German Andres Vallejo Direktor

© 2010 by Fachverlag Köhler
Kiesweg 23
D-35396 Gießen

Tel.: (+49) 06 41 / 95 22 0-0
Fax: (+49) 06 41 / 95 22 0-23
<http://www.offset-koehler.de>
e-mail: info@offset-koehler.de

ISBN 3-939403-02-9

Gesamtherstellung:
Offset-Köhler KG, Kiesweg 23, D-35396 Gießen

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

**Seroepidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung
Shigatoxin (Stx)2e-bildender *Escherichia coli*
in hessischen Schweinezuchtbeständen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
German Andres Vallejo Direktor
Diplom-Tierarzt aus Barranquilla, Kolumbien

Gießen, 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2010

Für meine Kinder Catalina und Daniel

Teile dieser Arbeit wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

Poster:

Barth, S., Tscholshiew, A., Vallejo, G., and Bauerfeind, R. 2003. Characterization of Shigatoxin-encoding *Escherichia coli* (STEC) isolates from pigs in Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 421.

Barth, S., Panzer, H.H., Tscholshiew, A., Vallejo, G. and Bauerfeind, R. 2006. Some Stx2e-encoding *Escherichia coli* from pigs possess virulence gene patterns identical to those reported for human isolates. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 87.

Vorträge:

Barth, S., Vallejo, G., Damriyasa, IM., Bauer, C., und Bauerfeind, R. 2002. Untersuchungen zur Seroprävalenz von shigatoxinbildenden-*E. coli* in südhessischen Schweine-zuchtbeständen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **115**(9-10): 327-328.

Barth, S., Vallejo, G., Failing, K., Damriyasa, IM., Bauer, C., and Bauerfeind, R. 2003. Seroprevalence of Shigatoxin producing *Escherichia coli* in breeding sows in Hesse, Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 139-140.

Bauerfeind, R., Barth, S., Tscholshiew, A., Vallejo, G., and Weiß, R. 2004. Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* bei Zucht- und Mastschweinen in Deutschland. 1. EHEC-Workshop 2004 der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. Wildbad Kreuth, 22. - 24. Juli 2004.

Barth, S., Tscholshiew, A., Vallejo, G., Weiß, R., Baljer, G., und Bauerfeind, R. 2004. Molekulargenetische Untersuchungen zur Bewertung des zoonotischen Potentials Shigatoxin-bildender *Escherichia coli*-Isolate von Schweinen. Tiermedizin in Gießen – Zeitschrift des Vereins der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen e.V. **10**(2): 43-44.

Barth, S., Tscholshiew, A., Vallejo, G., Weiß, R., und Bauerfeind, R. 2004. Nachweis von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (STEC) bei Zucht- und Mastschweinen in Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **117**(11-12): 446.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Promotionsstipendiums vom Katholischen Akademischen Ausländer-Dienst (KAAD) gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Ödemkrankheit bei Schweinen	2
2.1.1 Pathogenese und Klinik	2
2.1.2 Prophylaxe und Therapie	3
2.2 Enterotoxämische <i>Escherichia coli</i> (EDEC)	6
2.2.1 Shigatoxin 2e	7
2.2.2 F18-Fimbrien	10
2.2.3 <i>E. coli</i> - α -Hämolysin	11
2.2.4 O-Antigene	11
2.2.5 <i>E. coli</i> -Enterotoxine	12
2.3 Verbreitung und Häufigkeit von enterotoxämischen <i>E. coli</i>	12
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Material	18
3.1.1 Bakterienstämme	18
3.1.2 Impfstoffe	18
3.1.3 Adjuvantien	18
3.1.4 Tiere	20
3.1.5 Blut- und Serumproben	20
3.1.6 Monoklonale Antikörper	20
3.1.7 Konjugate	20
3.1.8 Oligodesoxyribonukleotide	21
3.1.9 Zelllinien	21
3.2 Bakteriologische Methoden	24
3.2.1 Standardanzucht von Bakterien	24
3.2.2 Anzucht von transformierten <i>E. coli</i> -Bakterien	24
3.2.3 Nachweis von Hämolyse	24
3.2.4 O-Antigenbestimmung der <i>E. coli</i> -Isolate	24
3.2.5 Präparation von Bakterienlysat	24
3.3 Molekularbiologische Methoden	25
3.3.1 DNS-Präparation	25
3.3.2 Bestimmung der DNS-Konzentration	25
3.3.3 DNS-Aufreinigung	25
3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.3.5 Agarosegelelektrophorese	27
3.3.6 DNS-Sequenzierung	27
3.4 Zellkulturverfahren	28
3.4.1 Kultivierung von Zellen	28
3.4.2 Stx2e-Neutralisationstest	28
3.5 Proteinanalytische Methoden	29
3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	29

3.5.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung an einer Ni ²⁺ -NTA-Matrix	30
3.5.3	Tricine-SDS-PAGE.....	30
3.6	Serologische Methoden	30
3.6.1	Westernblot-Verfahren	30
3.6.2	Enzyme-linked immunosorbent assay (rHis-StxB2e-ELISA).....	31
3.7	Immunisierungsverfahren	32
3.8	Datenhaltung und Auswertung	33
3.8.1	Bilddokumentation.....	33
3.8.2	Auswertung von DNS-Sequenzdaten	33
3.8.3	Statistische Auswertung	33
4	ERGEBNISSE	36
4.1	Charakterisierung von porcinen <i>Escherichia coli</i>-Feldisolaten.....	36
4.2	Etablierung und Evaluierung des rHis-StxB2e-ELISA	39
4.2.1	Identitätsprüfung des <i>E. coli</i> -Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24)	39
4.2.2	Reinheitsprüfung des rHis-StxB2e-Antigens	41
4.2.3	Intra- und Interassaypräzision.....	43
4.2.4	Berechnung von Grenzwerten (Cut-Off)	45
4.2.5	Prüfung des rHis-StxB2e-ELISA an Serumproben von geimpften Schweinen	46
4.3	Antigenität und Immunogenität von rHis-StxB2e.....	46
4.3.1	Herstellung eines Hyperimmunserums gegen rHis-StxB2e im Kaninchen (Immunisierungsversuch Nr. 1)	47
4.3.2	Immunogenität von rHis-StxB2e bei Kaninchen (Immunisierungsversuch Nr. 2).....	48
4.3.3	Immunogenität von rHis-StxB2e bei Ferkeln (Immunisierungsversuch Nr. 3).....	51
4.4	Nachweis von Stx2e-spezifischen Antikörpern bei Zuchtsauen in Hessen	54
4.4.1	Häufigkeit auf Tier- und Betriebsebenen (ELISA-Ergebnisse).....	54
4.4.2	Zusammenhang zwischen betrieblichen Parametern und der Häufigkeit seropositiver Zuchtsauen im Betrieb	56
4.4.3	Nachweis von Stx2e-neutralisierenden IgG-Antikörpern in Plasmaproben.....	64
5	DISKUSSION	65
6	ZUSAMMENFASSUNG, SUMMARY	78
7	LITERATURVERZEICHNIS	82
8	ANHANG.....	98
8.1	Nährmedien zur Anzucht von Bakterien	98
8.2	Puffer und Lösungen	98
8.3	Einzelwerte aus dem rHis-StxB2e-ELISA.....	103
	DANKSAGUNG	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz
A. dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin [jetzt BfR: Bundesinstitut für Risikobewertung]
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD ₅₀	zytotoxische Dosis 50 %
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum
FPLC®	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
i.m.	intramuskulär
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
LB	Luria Bertani
m	milli (10 ⁻³)
mAk	monoklonaler Antikörper
μ	mikro (10 ⁻⁶)
M	molar
MDa	Megadalton
MM	Molekulare Masse
min	Minute
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	arithmetischer Mittelwert
N	Anzahl der Tiere
n	nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rHis-StxB2e	rekombinante Histidin-markierte B-Untereinheit des Shigatoxins Typ 2e
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Stabwn	Standardabweichung
s.k.	subkutan
STEC	Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shigatoxin
StxA	A-Untereinheit des Shigatoxins
StxB	B-Untereinheit des Shigatoxins
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VK	Variationskoeffizient
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 EINLEITUNG

Die Ödemkrankheit (engl. Edema Disease, ED; syn. *E. coli*-Enterotoxämie) ist eine weltweit in Intensivhaltungen verbreitete lebensgefährliche Infektionskrankheit, die vorzugsweise bei Ferkeln während der ersten beiden Wochen nach dem Absetzen vom Muttertier auftritt (**Heidrich, 1966; Nielsen, 1986; Sojka, 1965; Timoney, 1950**). Ursache der Ödemkrankheit ist eine Untergruppe der Shigatoxin (Stx)-bildenden *Escherichia coli* (STEC), und zwar die Stx2e-bildenden *E. coli*-Bakterien (EDEC, edema disease *E. coli*) (**Smith and Halls, 1968**). EDEC heften sich mit Hilfe spezieller adhäsiver Fimbrien (F18-Fimbrien) an Schleimhautepithelzellen an und besiedeln den Dünndarm der Absetzferkel (**Bertschinger et al., 1990**). Das Stx2e, ein AB₅-Exotoxin, bestehend aus einer A- und fünf identischen B-Untereinheiten, und die F18-Fimbrien stellen dabei die Hauptvirulenzfaktoren der EDEC dar.

Angaben zur Verbreitung und Häufigkeit der Ödemkrankheit stützen sich derzeit nur auf den Nachweis der EDEC in Schweinepopulationen. Allerdings ist bekannt, dass EDEC im Verlauf der Infektion häufig intermittierend ausgeschieden werden und vor allem bei klinisch-inapparent infizierten Tieren nur zeitweilig nachweisbar sind (**Lege, 2003; Wieler et al., 1995**). Im Rahmen einer früheren Studie wurde die B-Untereinheit des Stx2e rekombinant hergestellt und als Fangantigen in einem ELISA zum Nachweis Stx2e-spezifischer Antikörper eingesetzt (**Lege, 2003**). Die dabei in sechs Schweinezuchtbetrieben erhobenen Daten zeigten, dass über 95 % der Muttersauen Stx2e-Antikörper aufwiesen und somit eine deutlich höhere Seroprävalenz aufwiesen als erwartet.

Um diese in sechs Betrieben erhobenen Daten an einer größeren Schweinepopulation zu überprüfen, wurden Serumproben von repräsentativen Zuchtsauen aus Betrieben in Südhessen untersucht. Zusätzlich wurden *E. coli*-Isolate von 975 Schweinen auf EDEC-spezifische Merkmale (Stx2e, F18-Fimbrien, *E. coli*-Enterotoxine, α -Hämolysin, O-Antigen) geprüft. Insbesondere sollten hiermit Antworten auf die folgenden Fragen gegeben werden:

1. Gibt es bei Stx2e-bildenden *E. coli* vom Schwein noch weitere gemeinsame Antigene, die sich zum Nachweis EDEC-spezifischer Immunreaktionen eignen?
2. Wie hoch ist die Seroprävalenz von EDEC bei Zuchtsauen aus Südhessen?
3. Haben die Haltungsweise oder Hygienemaßnahmen einen Einfluss auf die Häufigkeit von EDEC-Infektionen in Schweinezuchtbetrieben?
4. Eignet sich die rekombinant hergestellte B-Untereinheit von Stx2e als Impfantigen dazu, Stx2e-neutralisierende Antikörper im Tier zu induzieren?

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Ödemkrankheit bei Schweinen

Die Ödemkrankheit wurde zuerst in Irland von Shanks als ein außergewöhnlicher Zustand beschrieben, der den Verdauungsapparat des Schweins beeinflusst (**Shanks, 1938**). Der erste Bericht zur Ödemkrankheit in Deutschland stammt aus dem Jahr 1956 von Hagen (**Heidrich, 1966**). Im Jahr 1950 wurde die Krankheit zum ersten Mal durch intravenöse Applikation von Kulturüberständen des Darminhalts erkrankter Schweine reproduziert (**Timoney, 1950**). Einige Jahre später wurde beobachtet, dass hämolysierende *E. coli*-Bakterien mit der Ödemkrankheit in Verbindung stehen (**Gregory, 1955; Schofield and Davis, 1955**). Ende der siebziger sowie Anfang der achtziger Jahre zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass einige aus Menschen sowie aus an der Ödemkrankheit erkrankten Schweinen isolierte *E. coli*-Stämme ein Zytotoxin produzierten (**Blanco et al., 1983; Clugston and Nielsen, 1974; Clugston et al., 1974a; 1974b; Dobrescu, 1983; Konowalchuk et al., 1977; Smith et al., 1983**). Dieses Toxin war zytotoxisch für Verzellen und mit dem Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* nahe verwandt. Eine endgültige Reproduktion der klinischen Symptomatik sowie der typischen pathologisch-anatomischen Veränderungen der Ödemkrankheit gelang Anfang der neunziger Jahre durch intravenöse Verabreichung von aufgereinigtem Stx2e (**Gannon et al., 1989; Gordon et al., 1992; MacLeod and Gyles, 1990; MacLeod et al., 1991**).

2.1.1 Pathogenese und Klinik

Ursache der Ödemkrankheit der Schweine ist eine Darminfektion mit sogenannten enterotoxämischen *E. coli* (Edema Disease *E. coli*, EDEC), die die Fähigkeit zur Adhäsion durch F18-Fimbrien sowie zur Bildung von Stx2e besitzen (**Gyles, 1994**). Nach oraler Aufnahme vermehren sich diese Bakterien im Verdauungstrakt der Ferkel und besiedeln den Dünndarm, insbesondere das Jejunum und das Ileum. Für die erfolgreiche Besiedlung des Darmes sind spezielle Adhäsionsmechanismen verantwortlich. EDEC besitzen auf ihrer Oberfläche Fimbrien des Typs F18, die über einen spezifischen Rezeptor (ECF18R) das Haften an der Darmschleimhaut ermöglichen und so den Abtransport der Bakterien mit dem Darminhalt verhindern (**Bertschinger and Pohlenz, 1983; Bertschinger et al., 1990; Vögeli et al., 1997**). Nach der Besiedlung des Dünndarmes bilden die EDEC das Stx2e, das auf bisher nicht näher bekannte Weise vom Darmlumen über die Epithelbarriere hinweg in die Blutbahn gelangt und dann, gebunden an Erythrozyten, in alle Organe vordringt (**Matise et al., 2003**). Die Bindung des Toxins an die Zielzellen erfolgt über Globotetraosylceramid-Rezeptoren (Gb4Cer) in den Endothelzellmembranen. Nach Internalisierung gehen betroffene Zellen durch Hemmung der Proteinbiosynthese zugrunde (**De Grandis et al., 1989; Sandvig and van Deurs, 1996**).

Auslöser der Ödemkrankheit sind letztlich eine starke Erregervermehrung der EDEC-Bakterien im Darm begünstigt durch die Umstellung auf Futterrationen mit einem hohen Proteingehalt während des Absetzens, der Verlust des passiven Schutzes durch Verminderung der maternalen Antikörper, die Umgebungstemperatur, der Absetz- bzw.

Umstellungsstress und/oder eine genetische Disposition der Ferkel (**Bosworth et al., 1996; Deperez et al., 1986; Gannon et al., 1988; Imberechts et al., 1992; Schofield and Schroder, 1954; Smith and Halls, 1968; Sojka et al., 1957**).

Die Ödemkrankheit bei Ferkeln ist durch zentralnervöse Störungen wie Ataxie, Muskelzittern, Paralyse der Gliedmaßen, Festliegen in Seitenlage, tonisch-klonische Krämpfe sowie Ödeme in der Unterhaut charakterisiert (**Kurtz et al., 1969; Timoney, 1950**). Bei klinisch erkrankten Tieren tritt der Tod meist innerhalb von 24 Stunden ein. Überlebende Tiere weisen später in der Mehrzahl Entwicklungsstörungen auf (**Moxley, 2000**). Die Symptome treten vor allem im Kopfbereich an Ohren, Augenlidern, Nasenrücken sowie der intestinalen Schleimhaut auf. Diese Symptome sind die Folge einer systemischen Schädigung der Blutgefäße, die unmittelbar zu perivaskulären Ödemen, Hämorrhagien und ischämischen Nekrosen des umliegenden Parenchyms führen. Des Weiteren sind Durchfall, Fieber und Exsikkose häufig zu beobachten, aber nicht typisch (**Nielsen, 1986**). Die Erkrankung bricht zumeist ein bis zwei Wochen nach dem Absetzen von der Muttersau aus. Betroffen sind aber auch Saugferkel oder Mast- und Zuchtschweine. Insbesondere erkranken gut entwickelte Ferkel eines Wurfes oder einer Mastgruppe gleichzeitig bzw. in kurzen Zeitabständen. Die Morbidität ist in betroffenen Beständen mit 10-35 % zu beziffern. Die Letalität ist mit 20-100 % als sehr hoch einzustufen (**Kernkamp et al., 1965; Sojka, 1965**).

Bei der Sektion verendeter Tiere werden Ödeme in den Bereichen der Subkutis, besonders am Nasenrücken und an den Augenlidern, der vorderen Magenwand, des Kolonmesenteriums, der Mesenteriallymphknoten, des Gehirns und der Lunge gefunden (**Heidrich, 1966; Nielsen, 1986; Sojka, 1965; Timoney, 1950**). Die Körperhöhlen können mäßige Mengen serofibrinöser Ergüsse enthalten (**Kurtz et al., 1969**). Histopathologisch stellen sich atrophisierte und ödematisierte Zotten im Jejunum und Ileum sowie nekrotische Lymphozyten in den Peyerschen Plaques des Dünndarms und den Sekundärfollikeln der mesenterialen Lymphknoten dar (**Appel et al., 1990**). Auch im Gehirn der Ferkel sind als Kennzeichen der zerebrospinalen Angiopathie perivaskuläre Ödeme und fokale Nekrosen im Parenchym und der *Pia mater* nachweisbar (**Kausche et al., 1992; Kurtz et al., 1969**). Im peripheren Gewebe stellen sich Endothelschwellungen, Nekrosen der glatten Muskelzellen der *Tunica media*, Gefäßläsionen von kleinen Arterien und Arteriolen in der Mukosa des Dünndarms und die Formation von Mikrothromben dar (**Gannon et al., 1989; Kurtz et al., 1969; MacLeod et al., 1991; Matise et al., 2000; Methiyapun et al., 1984; Nielsen, 1986**).

2.1.2 Prophylaxe und Therapie

Die Behandlung klinisch kranker Tiere kann durch wiederholte parenterale Chemotherapie und Antihistaminika erfolgen (**Waldmann und Wendt, 2001**). Eine Therapie durch Behandlung mit Neuroleptika und zentralnervösen Stimulanzien ist nur bedingt im Anfangsstadium ohne bis dahin aufgetretene gravierende Schädigungen des ZNS erfolgreich (**Bilkei, 1989; Orban et al., 1993**). Der zusätzliche Einsatz von Glukocorticoiden und peripher angreifenden Kreislaufmitteln bringt keine wesentliche Besserung (**Moxley, 2000; Waldmann und Wendt, 2001**). Der Erfolg einer Behandlung ist bezüglich der Mortalität und des ökonomischen Nutzens als unsicher einzustufen. Eine prophylaktische Behandlung mit

dem Neuroleptikum Acepromazin soll eine signifikante Reduzierung der Todesfälle bei Schweinen bewirken (**Bilkei und Bölskei, 1995**).

Eine metaphylaktische Applikation von antimikrobiellen Chemotherapeutika soll über das Trinkwasser oder Futter, nach vorhergehender Resistenzprüfung der Bakterien, einige Tage vor bis 2 Wochen nach dem Absetzen erfolgen. Bewährt habe sich hier der Einsatz von Colistinsulfat, Apramycin oder Neomycinsulfat. Zu beachten sei dabei, dass zur Vermeidung von Resistenzen das Antibiotikum dem Wasser oder Futter in hohen Dosierungen über einen langen Zeitraum beigemischt werden müsse (**Bilkei, 1979**). Zur Vermeidung der Ödemkrankheit werden neben dem Einsatz von Antibiotika häufig höhere Mengen an Zinkoxid unmittelbar nach dem Absetzen verabreicht. Hohe Dosierungen von Zinkoxid haben einen bakteriziden Effekt, reduzieren unerwünschte Mikroorganismen, senken dadurch die Belastung durch bakterielle Toxine und haben einen leistungsfördernden Effekt (**Waldmann und Wendt, 2001**). Der Zusatz von Zinkoxid zum Futter ist jedoch aufgrund der Schwermetallproblematik nach dem Arznei- und Futtermittelrecht nicht erlaubt.

Durch eine angepasste Futterzusammensetzung (verminderter Kohlenhydrat- und Proteinanteil) kann die überproportionale Vermehrung der EDEC prophylaktisch inhibiert werden. Dazu wird das Futter auf einen Gehalt von 5 % Rohprotein bei 17 % Rohfaseranteil eingestellt (**Bertschinger et al., 1983**). Alternativ kann ein mehrtägiger Futterentzug bei reichlichem Wasserangebot durchgeführt werden. Dann wird von der strikt rationierten Fütterung allmählich wieder auf das normale Fütterungsniveau zurückgegangen, ohne die Futterqualität zu ändern (**Waldmann und Wendt, 2001**).

Der Einsatz von verschiedenen Probiotika (*Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Lactobacillus* spp. oder *Streptococcus faecium*) konnte weder die Ferkelverlustrate infolge der Ödemkrankheit nach experimenteller Infektion mit *E. coli* O141:K85ab noch die Keimzahl von EDEC im Kot vermindern (**De Cupere et al., 1992**).

Da es derzeit keine wirtschaftlich vertretbare Therapie der Ödemkrankheit gibt, setzt man bei der Bekämpfung der Erkrankung große Hoffnungen auf prophylaktische Maßnahmen. Hierbei stehen vor allem die Suche nach einem geeigneten Impfstoff und die Zucht resistenter Schweinelinien im Mittelpunkt. Die humorale Immunantwort scheint eine essentielle Rolle bei der Pathogenese der Ödemkrankheit zu spielen. Aus diesem Grund haben sich bereits einige Forschergruppen mit der aktiven und passiven Immunisierung beschäftigt und gezeigt, dass Antikörper gegen F18 oder Stx2e vor der Erkrankung schützen können (**Moxley, 2000**). Zur Induktion einer Immunität gegenüber dem Stx2e wurde ein mit Glutaraldehyd behandeltes Stx2e-Toxoid hergestellt und Saugferkeln im Alter von ein bzw. zwei Wochen sowie Absatzferkeln subkutan appliziert (**Awad-Masalmeh et al., 1989; Docic and Bilkei, 2003; Gordon et al., 1992; MacLeod and Gyles, 1991**). Bei der nachfolgenden oralen Inokulation eines Stx2e-produzierenden *E. coli*-Stammes als Belastungskeim entwickelten die geimpften Tiere seltener Ödemkrankheit als nicht geimpfte Kontrolltiere. Um die chemische Inaktivierung zu umgehen, wurden auch Versuche mit gentechnisch verändertem Stx2e durchgeführt. Hierbei wurden Aminosäuren im katalytischen Zentrum der A-Untereinheit des Toxins ausgetauscht, was die Toxizität des Stx2e-Moleküls noch besser und zuverlässiger reduzierte als die Behandlung mit Glutaraldehyd (**Bosworth et al., 1996**;

Gordon et al., 1992; Hoffmann, 2010; Makino et al., 2001). Der Erfolg der Impfung war messbar an den Stx2e-neutralisierenden Antikörpern in den Serumproben der Ferkel (**Gordon et al., 1992; Hoffmann, 2010**). Auch mit Lebendvakzinen aus F18ab-exprimierenden *E. coli*-Keimen wurde Immunität in den Impflingen erzeugt, die sich in einer reduzierten Kolonisation bei der Infektion mit enterotoxämischen *E. coli* messen ließ (**Sarrazin and Bertschinger, 1997**). Weitere Versuche wurden mit passiven Immunisierungen von Ferkeln durch orale Verabreichung von aus Hühnereiern gewonnenen F18-Antikörpern unternommen. Auch hiermit ließ sich die Anheftung von EDEC-Stämmen an die Darmschleimhaut reduzieren (**Imberechts et al., 1997**). So schieden die mit F18-Antikörpern gefütterten Absatzferkel im Vergleich zur Kontrollgruppe bei nachfolgender oraler Infektion mit F18-positiven *E. coli* die Keime in geringer Anzahl aus. *In vitro* hemmen F18-spezifische Antikörper die Adhäsion der F18-positiven *E. coli* an die Darmschleimhaut (**Imberechts et al., 1994**). Auch die intramuskuläre Verabreichung von Stx2e-spezifischem Pferdehyperimmunserum (**Johansen et al., 2000**) oder eine intraperitoneale Verabreichung von aus Schweinen gewonnenen Stx2e-Antikörpern waren erfolgreich (**Matise et al., 2001**). Versuche zur passiven Kreuzimmunisierung mit Stx2-spezifischen Antikörpern zeigten, dass nur Tiere, die hohe Antikörpermengen verabreicht bekommen hatten, vor dem Ausbruch der Ödemkrankheit geschützt waren (**MacLeod and Gyles, 1991**).

Ein weiterer Ansatz zur Prävention der Ödemkrankheit ergab sich aus der Beobachtung, dass die Empfänglichkeit zur Besiedlung mit EDEC durch den Wirt genetisch kontrolliert und dominant vererbt wird (**Bertschinger et al., 1993; Smith and Halls, 1968**). Mittels Applikation von F18-Fimbrien-exprimierenden *E. coli* an Nachkommen aus gezielten Paarungen wurde gezeigt, dass das Risiko für die Erkrankung an Ödemkrankheit durch den *E. coli*-F18-Rezeptor (ECF18R)-Lokus reguliert wird. Dieser Gen-Lokus kodiert die Expression spezifischer ECF18R-Rezeptoren für F18-Fimbrien in der Enterozytenmembran. Das Gen existiert in zwei Allel-Formen mit Dominanz des pathologisch relevanten Allels "B" über das rezessive resistenzvermittelnde Allel "b" (**Bertschinger et al., 1993; Vögeli et al., 1996**). Mit Hilfe von *in vitro*-Adhäsionstests an isolierten Enterozyten wurde gezeigt, dass sowohl die F18ac- als auch die F18ab-Fimbriensubtypen vermutlich denselben Rezeptor zur Anheftung nutzen (**Esser, 1999; Stamm and Bertschinger, 1992**). Die von Rasse zu Rasse unterschiedlichen Allelfrequenzen gaben Hinweise auf die züchterischen Möglichkeiten zur Selektion von Zuchttieren mit Resistenz gegen die Ödemkrankheit (**Vögeli et al., 1997**). Bewiesen wurde die Rassedisposition mit experimentellen Infektionen von Schweinen aus einer geschlossenen Herde. Im Ergebnis zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Ebers auf die Erregerausscheidung im Kot sowie auf die Ödemkrankheit-Mortalität unter den Nachkommen, wobei die Resistenz der Ferkel gegen die Ödemkrankheit mit der geringeren fäkalen Erregerkonzentration korrelierte (**Bertschinger et al., 1986**). In einer schweizerischen Studie lag der Anteil der F18-Fimbrien-resistenten Tiere in der Rasse Deutsches Edelschwein bei 6,7 % und in der Veredelten Landrasse bei 2,2 % (**Leemann, 1993**). In einer deutschen Studie ergaben sich dagegen höhere Resistenzhäufigkeiten für die verschiedenen Rassen. Hier waren 11,0 % der Deutschen Edelschweine, 6,9 % der Deutschen Landrasse-Tiere und 8,3 % der Piétrain-Schweine für eine Kolonisation mit F18-tragenden *E. coli*-Stämmen nicht empfänglich (**Esser, 1999**). Die Ausbildung der ECF18-Rezeptoren scheint zudem auch noch altersabhängig zu sein. Adhäsionsexperimente

belegten nämlich, dass der Erreger bei neugeborenen Ferkeln weder *in vitro* noch *in vivo* an die Darmepithelzellen adhärierte, und zwar unabhängig vom vorhandenen FUT1-Allel. Dagegen waren ältere Tiere von empfänglichen Zuchtlinien für die Kolonisation durch die *E. coli* empfänglich. Enterozyten von 21 Tage alten Tieren wurden im Vergleich zu zehn Tage alten Ferkeln signifikant stärker besiedelt. Dies deutet auf eine progressive Entwicklung der Rezeptoren hin, welche die ersten drei Lebenswochen andauert (**Nagy et al., 1992**).

2.2 Enterotoxämische *Escherichia coli* (EDEC)

E. coli sind gramnegative, gerade Stäbchen, die bis zu 2 µm lang sind und einen Durchmesser von ca. 0,7 µm haben (**Rolle and Mayr, 2002**). Die meisten Stämme sind aufgrund ihrer Begeißelung beweglich. Der natürliche Lebensraum von *E. coli* ist der Dickdarm von Tier und Mensch. *E. coli* gehört damit zum Bestand der bakteriellen Normalflora. Die Bakterienart *E. coli* ist als fakultativ pathogen anzusehen, da nach derzeitigem Kenntnisstand alle Stämme unter bestimmten Bedingungen dazu fähig sind, Krankheitszustände bei ihren Wirten zu verursachen, beispielsweise, wenn sie in Gewebe außerhalb des Darmes verschleppt und vom Immunsystem nicht schnell wieder eliminiert werden. Neben den fakultativ pathogenen gibt es einige obligat pathogene *E. coli*-Stämme, die infolge der Ausstattung mit besonderen Virulenzeigenschaften besonders häufig und mitunter auch zu besonders schweren Erkrankungen führen. Je nach Erkrankung und Virulenzfaktoren unterscheidet man hierbei verschiedene *E. coli*-Pathotypen (syn. *E. coli*-Pathovaren) (**Barth et al., 2007; Beutin and Montenegro, 1990**).

Darmpathogene *E. coli* besitzen durch Adhäsionsfaktoren spezifische Affinität zu Darmepithelzellen, wodurch die Kolonisation des Dünndarms ermöglicht wird. Die Vielfalt der Symptome und Virulenzfaktoren ermöglicht die Zuordnung der darmpathogenen *E. coli* zu den folgenden sieben Pathovaren (**Baljer and Wieler, 1998; Bischoff et al., 2005; Levine, 1987; Nataro and Kaper, 1998**): Stx-produzierende *E. coli* (STEC), die sich in enterotoxämische und enterohämorrhagische *E. coli* unterteilen lassen, sowie enterotoxische, enteropathogene, enteroinvasive, enteroaggregative, diffus adhärente und nekrotoxische *E. coli*. Einen Überblick über die verschiedenen Pathovaren, ihre charakteristischen Virulenzfaktoren sowie die von ihnen hervorgerufenen Symptome vermittelt die **Tabelle 1**.

STEC sind in der Lage, Shigatoxin von Typ 1 oder Typ 2 zu bilden (**Whittam, 1998**). Eine Untergruppe der STEC bilden die enterotoxämischen *E. coli*. Diese Stämme sind für die Entstehung der Ödemkrankheit beim Schwein verantwortlich (**Sarrazin and Bertschinger, 1997; Smith and Halls, 1968**) und bilden obligat ein Stx vom Typ Stx2e sowie F18-Fimbrien. Am häufigsten gehören EDEC den O-Typen O138, O139, O141 oder O147 an (**Blanco et al., 1983; Dobrescu, 1983; Gregory, 1955; Johnson et al., 1990; Mainil et al., 1989; Sojka et al., 1960**).

Tabelle 1 Einteilung und Charakteristika von darmpathogenen *E. coli*

Pathovar	wichtige Virulenzfaktoren		Erkrankung bei Tieren
	Adhäsionsfaktor	Toxin	
Shigatoxin-produzierende <i>E. coli</i> (STEC)			
enterotoxämische <i>E. coli</i> (EDEC)	F18ab-Fimbrien, AIDA	Shigatoxin 2e	Ödemkrankheit
enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	Intimin	Shigatoxin 1, Shigatoxin 2	blutige Diarrhoe
enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	F4-, F5-, F6-, F18ac-Fimbrien, CFA I, CFA III	ST-I, ST-II, LT	wässrige Diarrhoe
enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Intimin, BFP	nicht bekannt	wässrig- blutige Diarrhoe
enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Invasin	Sen	nicht bekannt
enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)	AAF/I-, AAF/II-Adhäsine	EAST1, Pet	wässrige Diarrhoe
diffus adhärenzte <i>E. coli</i> (DAEC)	F1845-Fimbrien, AIDA-, Afa-, Dr-Adhäsine	Sat	mukoide Diarrhoe
nekrotoxische <i>E. coli</i> (NTEC)	P-, F17-Fimbrien, Afa-Adhäsine	Cnf1, Cnf2, Cdt	Diarrhoe

Erläuterung: Aaf = aggregative adhesion fimbria (Nataro et al., 1998), Afa = afimbrial adhesin (Le Bouguénec and Bertin, 1999), AIDA = adhesin involved in diffuse adherence (Niewerth et al., 2001), BFP = bundling forming pili (Girón et al., 1991), Cdt = cytolethal distending toxin (De Rycke et al., 1999), CFA = colonization factor (Nataro and Kaper, 1998), Cnf = cytotoxic necrotoxic factor (De Rycke et al., 1999), EAST1 = hitzestabiles *E. coli* Enterotoxin (Yamamoto and Echeverria, 1996), LT = hitzelabiles *E. coli* Enterotoxin (Nataro and Kaper, 1998), Pet = plasmid-encoded Toxin (Eslava et al., 1998), Sat = secreted autotransporter toxin (Taddei et al., 2003), Sen = *Shigella* enterotoxin (Nataro et al., 1995), ST-I = hitzestabiles *E. coli* Enterotoxin I (Nataro and Kaper, 1998), ST-II = hitzestabiles *E. coli* Enterotoxin II (Nataro and Kaper, 1998).

2.2.1 Shigatoxin 2e

Shigatoxin (Stx) wurde erstmals von Kioshi Shiga 1898 nach dem Auftreten einer bakteriellen Dysenterie (*Shigella dysenteriae* Typ 1) bei menschlichen Patienten als ursächliches Agens isoliert. Konowalchuk et al. (1977) berichteten über einige Toxine, die letal für Verotozellen waren und gaben dieser Gruppe von Zytotoxinen den Namen "Verotoxine". Einige Jahre später erkannte man die nahe strukturelle und antigene Verwandtschaft der Verotoxine zu dem Stx von *Shigella dysenteriae* Typ 1, so dass die Verotoxine in der Folge auch als "Shiga-like-Toxine" (SLT) bezeichnet wurden (O'Brien and LaVeck, 1983). Die gleichzeitige Entdeckung von Stx durch verschiedene Forschungsgruppen hat zu parallelen Nomenklatorsystemen geführt. Bezeichnungen wie "Verotoxin" (VT) oder "Shiga-like-Toxin" wurden und werden nach wie vor in der Literatur synonym benutzt. Zur Vereinheitlichung wurde von Calderwood et al. (1996) eine einheitliche Nomenklatur postuliert, die von der

"American Society for Microbiology" übernommen wurde und auch in dieser Arbeit angewendet wird. Nach dieser Nomenklatur werden alle Verotoxine, Shiga-like-Toxine und das Shigatoxin als Shigatoxine bezeichnet, wobei man zwei Stx-Gruppen, Stx1 und Stx2, unterscheidet. Zur ersten Gruppe werden das Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 (Stx) und das Stx1 mit seinen Varianten Stx1c und Stx1d von *E. coli* gerechnet (**Bürk et al., 2003; Jackson et al., 1987; Ohmura-Hoshino et al., 2003; Paton et al., 1995; Zhang et al., 2002**). Vertreter der zweiten Gruppe sind das Stx2 und seine Varianten Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g und Stx2y (**Jelacic et al., 2003; Leung et al., 2003; Melton-Celsa et al., 1996; Piérard et al., 1998; Salvadori et al., 2001; Schmidt et al., 2000; Schmitt et al., 1991; Weinstein et al., 1988**). In der **Tabelle 2** sind die verschiedenen Shigatoxine, die verwendeten Synonyme sowie das Vorkommen bei Tieren aufgelistet.

STEC mit den Shigatoxin-Typen Stx1, Stx1c, Stx1d, Stx2, Stx2c, Stx2d und Stx2g wurden hauptsächlich in Kotproben von Rindern nachgewiesen. Die adulten Rinder zeigen hierbei keine Symptome, nur bei Kälbern spielen die STEC als Erreger von Durchfallerkrankungen eine Rolle (**Wieler et al., 1992**). Neben Rindern sind *E. coli*-Stämme mit Shigatoxinen des Typs Stx1c und Stx2d auch von gesunden Schafen isoliert worden (**Chapman et al., 1996**). Wiederkäuer, vor allem Rinder, sind für die meisten STEC-Typen das wichtigste Reservoir und gelten auch als bedeutsamste Quelle für die hochvirulenten, humanpathogenen Stämme, die EHEC-Bakterien. Im Gegensatz dazu wurden STEC, die für das Shigatoxin 2e kodieren, vorwiegend in Probenmaterial von Schweinen nachgewiesen (**Barth et al., 2007; Weinstein et al., 1988**). Aber es gibt auch Berichte über Stx2e-kodierende STEC bei Menschen und Rindern (**Beutin et al., 2004; Friedrich et al., 2002b; Shaw et al., 2004; Sonntag et al., 2005; Thomas et al., 1994; Vernozy-Rozand et al., 2004; Zhang et al., 2005**). Die vom Menschen isolierten Stx2e-produzierenden *E. coli* gehörten anderen Serogruppen an als die bei Schweinen nachgewiesenen Stämme und besaßen keine F18-Fimbrien (**Beutin et al., 2004; Franke et al., 1995b; Friedrich et al., 2002b; Piérard et al., 1991; Sonntag et al., 2005; Thomas et al., 1994**). Man nimmt deshalb an, dass typische EDEC-Stämme an Schweine angepasst und keine Zoonoseerreger sind.

Tabelle 2 Nomenklatur und Vorkommen von Mitgliedern der Shigatoxin-Familie bei *Escherichia coli* (nach Friedrich et al., 2002a; Jelacic et al., 2003; Leung et al., 2003; Mainil, 1999; Nakao et al., 2002; Salvadori et al., 2001; Ziebell et al., 2002).

Bezeichnung	Synonym(e)	häufig vorkommend bei
Stx1	VT1, SLT-I	Rind
Stx1c	Stx1OX3	Rind, Schaf
Stx1d	Stx1v52	Rind
Stx2	VT2, SLT-II, VT2t, SLT-II	Rind
Stx2c	VT2c, SLT-IIc, VT2vha, VT2vha, SLT-IIvha, SLT-IIvha	Rind
Stx2d	VT2d	Rind, Schaf
Stx2e	VT2e, SLT-IIe, VT-IIv, VT2v, VTe, SLT-IIv	Schwein
Stx2f	VT2ev, SLT-IIva, VT2va, VTe	Taube
Stx2g	VT2g	Rind
Stx2y	VT2y	Huhn

Alle Stx besitzen denselben molekularen Aufbau nach dem AB₅-Prinzip. Jedes Shigatoxin-Holotoxin-Molekül ist demnach aus einem Molekül der enzymatisch aktiven A-Untereinheit und fünf identischen Molekülen der B-Untereinheit aufgebaut. Die Bindung zwischen den Molekülen beruht auf elektrostatischen Kräften (Boodhoo et al., 1991; Donohue-Rolfe et al., 1989; Stein et al., 1992). Die A-Untereinheit weist zwei Domänen auf, die im Inneren der Zielzelle voneinander getrennt werden: das A1-Fragment mit der eigentlichen enzymatischen Aktivität und das A2-Fragment, welches das A1-Fragment mit dem B-Pentamer und die B-Untereinheiten untereinander verbindet. Die B-Untereinheiten vermitteln die Anheftung des Toxins an spezifische Glykolipide in der Zytoplasmamembran ihrer Zielzellen. Diese Rezeptoren kommen vor allem auf der luminalen Seite von Endothelzellen der kleinen Arterien und Arteriolen vor, die damit zu den primären Zielzellen der Stx zählen. Im Falle von Stx2e handelt es sich bei dem Rezeptor vor allem um das Globotetraosylceramid (Gb4Cer). Nach der Bindung des Holotoxins an seinen Rezeptor wird es über einen endozytotischen Vorgang von der Zelle aufgenommen und retrograd über den Golgi-Apparat in das Endoplasmatische Retikulum transportiert (De Grandis et al., 1989; Samuel et al., 1990). Im weiteren Verlauf wird das A1-Fragment durch zelleigenes Furin abgespalten und gelangt als enzymatisch aktives Molekül in das Zytoplasma. Das A1-Fragment besitzt bei allen Shigatoxintypen eine N-Glykosidase-Aktivität und bewirkt die glykosidische Abspaltung einer Adeninbase in der ribosomalen 28S-RNS. Dadurch wird die Bindung von Amino-acyl-tRNS an die Ribosomen verhindert, die Proteinbiosynthese der betroffenen Zellen kommt zum Erliegen, und die Zelle geht schlussendlich zugrunde (Brown et al., 1982; Hovde et al., 1988). Funktionale und vitale Schädigungen des Gefäßendothels lösen dann Prozesse aus, die zu den klinisch markanten Ödemen in der Subkutis, im Gastrointestinaltrakt, im ZNS und in anderen Organen führen (Kurtz et al., 1969; Mainil, 1999; Methiyapun et al., 1984). Im zellfreien System lässt sich die Wirkung des Shigatoxins als N-Glykosidase zwar alleine mit dem A1-Fragment simulieren, der toxische Effekt auf intakte Zellen lässt sich aber nur bei

Verwendung des kompletten Shigatoxins beobachten (**Mainil, 1999; O'Brien and Holmes, 1987**).

Die Gene vermutlich aller Shigatoxine sind in das Genom temperenter oder defekter Bakteriophagen integriert (**Schmidt, 2001**), das wiederum in das Chromosom der STEC inseriert ist (**Newland et al., 1985; O'Brien et al., 1989; Scotland et al., 1983; Strockbine et al., 1988; Weinstein et al., 1988**). Vergleiche der Aminosäuresequenzen zeigen eine 99 %-ige Übereinstimmung von Stx1 aus *E. coli* zum Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1. Sie unterscheiden sich nur in einer Aminosäure in der A-Untereinheit (**Calderwood et al., 1987; Karch et al., 1993; Strockbine et al., 1988**). Damit grenzen sich die Vertreter der Stx1-Gruppe deutlich von der Stx2-Gruppe ab, deren Aminosäuresequenzen mit denen von Stx1 nur zu 52-60 % identisch sind (**O'Brien et al., 1992; Weinstein et al., 1988**). Im Gegensatz zur Stx1-Gruppe gibt es in der Stx2-Gruppe antigene Unterschiede zwischen den Varianten (**Perera et al., 1988; Schmitt et al., 1991**). Diese Unterschiede sind vor allem in der Variabilität der Aminosäuresequenz der B-Untereinheiten begründet (**Schmitt et al., 1991**). Während beispielsweise die A-Untereinheiten von Stx2 und Stx2e zu etwa 94 % übereinstimmen, zeigen die B-Untereinheiten nur eine Übereinstimmung von 84 % (**Weinstein et al., 1988**). Die Strukturunterschiede machen sich auch in unterschiedlicher Rezeptorspezifität und Toxizität bemerkbar. So sind Stx2c und Stx2d gegenüber Verozellen weniger toxisch als Stx2 (**Lindgren et al., 1994**). Das Stx2e besitzt in der Verozellkultur eine ähnliche Aktivität wie Stx1 und Stx2, ist aber 100fach weniger toxisch als Stx2, wenn es intraperitoneal an Mäuse appliziert wird (**Samuel et al., 1990**). Studien mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern sowie molekulargenetische Verfahren (Nukleotid- und Aminosäuresequenzierungen) weisen Stx2e jedoch zweifelsfrei als Variante der Stx2-Gruppe aus (**Gyles et al., 1988; Linggood and Thompson, 1987; Marques et al., 1987; Smith and Johnson, 1988**).

2.2.2 F18-Fimbrien

Für die pathologische Besiedlung der Dünndarmschleimhaut mit *E. coli*-Bakterien sind spezielle Adhäsionsmechanismen verantwortlich. Das Haften dieser Bakterien an die Darmschleimhaut geschieht dabei meist mit Hilfe fimbrieller Adhäsine, die auf der bakteriellen Zelloberfläche lokalisiert sind. Fimbrielle Adhäsine sind Strukturproteine von Fimbrien, die mit einem strukturell genau dazu passenden Liganden (Rezeptor), beispielsweise im Mukus oder in der apikalen Zytoplasmamembran von Enterozyten, eine stabile Bindung eingehen. Diese Anheftung zwischen Fimbrien und Rezeptoren verhindert den Abtransport der Bakterien mit dem Darminhalt und ermöglicht so die Kolonisation des Darmes (**Rolle and Mayr, 2002**).

Bei den EDEC vermitteln die sog. F18-Fimbrien die Bindung an die Dünndarmepithelzellen (**Bertschinger et al., 1990**). Nur diejenigen Stx2e-positiven STEC-Stämme, die auch F18-Fimbrien bilden, kann man eigentlich als EDEC bezeichnen (**Moxley, 2000**). F18-Fimbrien wurden erstmals bei dem Stamm 107/86 (O139:K12:H1) nachgewiesen, dessen Adhäsionsvermögen sich von schweinepathogenen *E. coli*-Stämmen mit den bis dahin bekannten adhäsiven Fimbrien (F1, F4, F5, F6 und F41) unterschied. Vorübergehend wurden die neuen Fimbrien als F107 bezeichnet. (**Bertschinger et al., 1990; Imberechts et al., 1992**;

Imberechts et al., 1993). Zwei ähnliche Fimbrien wurden nach den Stamm-Bezeichnungen, bei denen die Varianten zuerst entdeckt wurden, als 2134P und 8813 benannt. Heute ist klar, dass es sich bei den zwei serologisch unterscheidbaren Varianten um die nun einheitlich als F18 klassifizierten Fimbrien handelt. Da die Varianten neben unterschiedlichen antigenen Komponenten (b und c) auch kreuzreagierende Komponenten (a) besitzen, werden sie als F18ab (ehemals F107) und F18ac (ehemals 2134P und 8813) bezeichnet (**Imberechts et al., 1994; Kennan et al., 1995; Nagy et al., 1999; Rippinger et al., 1995; Salajka et al., 1992; Dean-Nystrom et al., 1993**). Die F18ab-Variante kommt vor allem bei EDEC-Stämmen vor, während es sich bei den F18ac-exprimierenden Bakterien vorwiegend um enterotoxische *E. coli*-Stämme (ETEC) handelt (**Rippinger et al., 1995; Wittig et al., 1994**). Die Entschlüsselung des *fedA*-Gens, welches für das Hauptstrukturprotein der F18-Fimbrien kodiert, erfolgte durch **Imberechts et al. (1992)**. Die Primärstruktur von FedA variiert. So ergab die Sequenzierung am Beispiel von zehn Isolaten von Ferkeln mit Ödemkrankheit bzw. Absetzdurchfall sieben unterschiedliche Aminosäuresequenzen mit mindestens 91,3 % Homologie (**Imberechts et al., 1992; Imberechts et al., 1994**). Als Adhäsine fungiert vermutlich das Nebenstrukturprotein FedF, das in seiner Struktur deutlich weniger variabel ist als FedA (**Imberechts et al., 1996**).

2.2.3 *E. coli*- α -Hämolysin

Ein sehr hoher Prozentsatz der EDEC-Stämme zeigt bei Anzucht der Bakterien auf Schafblutagar eine Hämolyszone um die Kolonien (**Gallien et al., 1994; Gannon et al., 1988; Gregory, 1955; Osek, 1999b; Schofield and Davis, 1955**). Ursache hierfür ist das *E. coli*- α -Hämolysin (HlyA), ein 110 kDa großes Protein mit mehreren Membranbindungsstellen, das den Prototyp der RTX (Repeats-In-Toxin)-Toxinfamilie darstellt (**Bauer and Welch, 1996; Bhakdi et al., 1996; Gyles et al., 1974; Smith, 1963**). Das Gen des α -Hämolysins ist auf einem Plasmid lokalisiert, auf dem auch die Gene für die F18-Fimbrien und/oder die Gene von *E. coli*-Enterotoxinen kodiert werden (**Gyles, 1992; Wittig et al., 1994**). Die Fähigkeit zur Hämolysin-Bildung ist innerhalb der Spezies *E. coli* weit verbreitet und kommt bei allen *E. coli*-Pathovaren vor. Bei uropathogenen *E. coli* und auch bei Isolaten aus anderem extraintestinalen Gewebe ist die HlyA-Bildung besonders häufig zu beobachten (**Bhakdi et al., 1988**). Wie wichtig HlyA für das Haften und die Vermehrung des Erregers im infizierten Wirtsorganismus ist und ob es sich tatsächlich immer um einen regelrechten Virulenzfaktor der betreffenden *E. coli*-Stämme handelt, ist für die darmpathogenen *E. coli*-Pathovaren noch nicht geklärt (**Smith and Linggood, 1971**). Für α -hämolytische STEC vermutete man, dass es durch HlyA zur Freisetzung von Hämoglobin und Eisen aus Epithelzellen kommt, was die Vermehrung der STEC im infizierten Wirtsorganismus fördern könnte (**Law and Kelly, 1995**).

2.2.4 O-Antigene

Bedeutung im Hinblick auf die Differenzierung pathogener *E. coli*-Stämme kommt der Serotypisierung zu. Die Bestimmung von somatischen- (O), Kapsel- (K) und Geißel- (H) Antigenen ermöglicht eine Einteilung in verschiedene Serotypen. Derzeit sind 181 O-, 106 K- und 56 H-Antigene bekannt (**Anonym, 2003a; Anonym, 2006; Bettelheim, 2003**). Die Ödemkrank-

heitserreger gehören häufig den O/K-Typen O138:K81, O139:K82, O141:K85ab und O141:K85ac an (Blanco et al., 1983; Dobrescu, 1983; Gregory, 1955; Johnson et al., 1990; Mainil et al., 1989; Nielsen, 1986; Schofield and Schroder, 1954; Sojka et al., 1960). *E. coli*-Isolate mit den O-Typen O138, O139 oder O141 wurden bisher nicht mit Erkrankungen bei Menschen in Verbindung gebracht und scheinen somit spezifisch für Schweine-pathogene *E. coli* zu sein (Appel et al., 1989; Gannon and Gyles, 1990; Mainil, 1999; Paton and Paton, 1998). Stx2e-kodierende *E. coli*, die aus Stuhlproben von Menschen isoliert wurden, besaßen entweder die O-Antigene O9 oder O101 oder waren nicht typisierbar (Caprioli et al., 1993; Garabal et al., 1996; Kaufmann et al., 2006). Von Schweinen wurden auch EDEC der O-Typen O8, O149 und O157 isoliert; diese werden aber deutlich seltener gefunden als EDEC mit den oben genannten Serotypen (Barth et al., 2007; Gannon et al., 1988; Salajka et al., 1992).

2.2.5 *E. coli*-Enterotoxine

Neben dem Stx2e können EDEC auch noch für einen oder mehrere Vertreter der *E. coli*-Enterotoxine kodieren (Blanco et al., 1983; Gannon et al., 1988; Imberechts et al., 1994; Konowalchuk et al., 1977; Nagy et al., 1997). Diese Toxine werden in die hitzelabilen *E. coli*-Enterotoxine (LT) und hitzestabilen *E. coli*-Enterotoxine (ST) eingruppiert (Moxley, 2000; O'Brien and Holmes, 1987). Bei den hitzelabilen *E. coli*-Enterotoxinen werden LT-I und LT-II unterschieden (Green et al., 1983). Während LT-I vorwiegend von *E. coli*-Stämmen, die bei Menschen oder Schweinen vorkommen, gebildet wird, findet man LT-II in erster Linie bei *E. coli* von Büffeln und Rindern (Seriwatana et al., 1988). Auch die hitzestabilen *E. coli*-Enterotoxine werden in zwei Gruppen eingeteilt, STa (syn. ST-I) und STb (syn. ST-II) (Gyles, 1992), wobei STb fast ausschließlich bei ETEC-Isolaten aus Absetzferkeln vorkommt (Moon et al., 1986). In der Pathogenese von *E. coli*-bedingten Durchfallerkrankungen spielen die *E. coli*-Enterotoxine eine wichtige Rolle. Alle *E. coli*-Enterotoxine wirken schädigend auf die resorptiven und sekretorischen Fähigkeiten von Enterozyten des Dünndarms, wobei die Vitalität und Struktur des Darmepithels in der Regel erhalten bleiben. Infolgedessen gelangen so große Mengen an Flüssigkeit und Elektrolyten in das Lumen des Dünndarms, dass die Resorptionskapazität von Dünndarm und Dickdarm überfordert und ein wässriger Kot ausgeschieden wird (Waldmann und Wendt, 2001). *E. coli*-Stämme, die hitzelabiles Toxin produzieren, verursachen stärkere Diarrhoe und Dehydrierung als diejenigen Stämme, die nur ein hitzestabiles Toxin bilden. Man vermutet, dass der bei manchen Ödemkrankheitsfällen zu beobachtende Durchfall darauf zurückzuführen ist, dass entweder der betreffende EDEC-Stamm auch Enterotoxin(e) bildet oder eine Mischinfektion mit EDEC und einem Durchfallerreger vorliegt. In solchen Fällen kann der Tod der Tiere letztlich auch Folge der Diarrhoe und nicht der Stx2e-Wirkung sein (Bertschinger and Gyles, 1994).

2.3 Verbreitung und Häufigkeit von enterotoxämischen *E. coli*

Die enterotoxämischen *E. coli* zählen weltweit zu den häufigsten enteropathogenen Infektionserregern der Absetzferkel. International und speziell aus Deutschland liegen allerdings keine repräsentativen Daten zur Verbreitung und Häufigkeit der Ödem-

krankheitserreger sowie über das Auftreten von unterschiedlichen Erregerklonen vor (**Bertschinger and Gyles, 1994**). Dies liegt vermutlich zum einen an dem hohen methodischen Aufwand, der für den kulturell-bakteriologischen Nachweis von Ödemkrankheitserregern erforderlich ist, zum anderen gibt es noch kein kommerzielles Testsystem zur Messung der humoralen Immunreaktion gegen den Erreger. Die nachfolgend aufgeführten Daten bezüglich des Vorkommens von EDEC und STEC beziehen sich prozentual auf die Anzahl der *E. coli*-Gesamtisolate innerhalb der diskutierten Gruppen, da bei mehreren Studien keine Angaben zur Anzahl der beprobten Tiere vorlagen (**Tabelle 3**).

In Deutschland wurden im Zeitraum von 1989 bis 2003 Schweine verschiedener Altersgruppen (Saugferkel, Absatzferkel, Sau, Mastschwein) auf das Vorkommen von Shigatoxin-bildenden (STEC) und Ödemkrankheit-auslösenden (EDEC) *E. coli*-Stämmen untersucht (**Appel et al., 1989; Beutin et al., 1993; Bülte et al., 1990; Lege, 2003; Niewerth et al., 2001; Wieler et al., 1995; Wittig et al., 1995**). Dabei wurden sowohl gesunde als auch erkrankte Tiere beprobt. In der Gruppe der gesunden Tiere erwiesen sich 3,9 % aller *E. coli*-Isolate als STEC (**Beutin et al., 1993; Bülte et al., 1990**). Bei Absatzferkeln, welche entweder Ödemkrankheit (**Wieler et al., 1995**) oder Durchfall (**Wittig et al., 1995**) aufwiesen, wurden zusammengekommen 49 % aller Isolate STEC-positiv getestet. Auf EDEC-spezifische Merkmale wurden die STEC-Isolate von beiden Forschergruppen aber nicht untersucht. **Niewerth et al. (2001)** und **Lege (2003)** identifizierten unter den in Deutschland bei von Ödemkrankheit und Durchfall betroffenen Schweinen verschiedener Altersgruppen (Saugferkel bis Muttersau) isolierten Stämmen in 5,5 % der Fälle EDEC. **Tschäpe et al. (1992)** wiesen bei 116 *E. coli*-Isolaten, die von Schweinen mit Ödemkrankheit aus Deutschland und Schweden stammten, ausnahmslos STEC nach. Zu einer ebenfalls hohen Nachweisquote gelangten **Wasteson et al. (1992)** in einer norwegischen Studie an Absatzferkeln mit Ödemkrankheit. Hierin erwiesen sich 70 % der getesteten Isolate als Stx2e-positiv. **Aarestrup et al. (1997)** und **Frydendahl (2002)** berichteten über Untersuchungen an Absatzferkeln in Dänemark, welche an Ödemkrankheit bzw. Ödemkrankheit und Durchfall erkrankt waren. Sie identifizierten 53,4 % aller *E. coli*-Isolate als EDEC. Im Gegensatz zu Untersuchungen in Deutschland, Schweden und Norwegen, in denen alle Tiere mit Ödemkrankheit STEC ausschieden, wurden bei entsprechenden Tieren in Dänemark ausnahmslos EDEC detektiert (**Aarestrup et al., 1997**). In Polen wiesen Osek und Kollegen in mehreren Studien an Absatzferkeln mit Durchfallerkrankung bzw. mit Ödemkrankheit und Durchfall in 13 % der Fälle EDEC nach (**Osek et al., 1999; Osek, 1999a; 1999b; Osek, 2000a; 2000b**). Untersuchungen an durchfallerkrankten Ferkeln in Tschechien ergaben unter allen *E. coli*-Isolaten sogar einen EDEC-Anteil von 40,8 %, wobei andere STEC nicht nachweisbar waren (**Alexa et al., 2000**). Zwei Studien beschäftigten sich mit Absatzferkeln in Ungarn, die entweder an Durchfall oder an Ödemkrankheit mit Durchfall erkrankt waren. Während sich unter den *E. coli*-Isolaten, die von der ersten Gruppe isoliert worden waren, zu 8,3 % STEC befanden, betrug dieser Anteil in der Ferkelgruppe mit Ödemkrankheit 46,5 %, wobei sich 85 % dieser STEC sogar als EDEC erwiesen (**Nagy et al., 1990; 1999**). Die beobachtete Häufung von STEC- bzw. EDEC-Stämmen stimmt mit solchen in Deutschland überein.

In der Schweiz wurden im Zeitraum von 1992 bis 2000 insgesamt 249 *E. coli*-Isolate von Ferkeln (Alter über zwei Wochen), die allesamt an Ödemkrankheit und Durchfall litten, geprüft. Von diesen Isolatn erwiesen sich 32,5 % als EDEC und 18,1 % als andere STEC (**Boss et al., 1992; Imberechts et al., 1994; Sarrazin et al., 2000**). **Garabal et al. (1995)** wiesen in Spanien an Absatzferkeln mit Ödemkrankheit und Durchfall ebenfalls ausschließlich STEC (3,8 %) nach. Differenzierter, allerdings auch zeitabhängig, stellen sich Untersuchungsergebnisse aus England dar. Hier identifizierten **Sojka et al. (1960)** und **Saunders et al. (1960)** 17,5 % der insgesamt 2.383 untersuchten *E. coli*-Stämme, die aus Schweinen mit Ödemkrankheit und Durchfall isoliert wurden, anhand von α -Hämolysin in Blutagarplatten und Seroagglutination mit spezifischen Seren als EDEC. In späteren Arbeiten (**Linggood and Thompson, 1987; Woodward et al., 1992**) wurden neugeborene Ferkel und Absatzferkel, die an der Ödemkrankheit (**Linggood and Thompson, 1987**) oder an Durchfall (**Woodward et al., 1992**) erkrankt waren, untersucht. Bei den von der Ödemkrankheit befallenen Ferkeln (97 Isolate) wurden 39,2 % der Isolate als STEC identifiziert. In der Studie von **Woodward et al. (1992)** entpuppten sich 29,6 % der 115 Isolate von Schweinen mit Durchfall als EDEC.

Von den außerhalb Europas durchgeführten Studien sind insbesondere diejenigen Befunde hervorzuheben, die in Kanada an Schweinen mit Ödemkrankheit und Durchfall erhoben worden waren. Unter den 668 untersuchten Isolatn wurde mit 4,8 % ein STEC-Prozentsatz ermittelt, der deutlich niedriger ist als in den meisten europäischen Berichten. Eine gezielte Untersuchung auf EDEC wurde allerdings nicht durchgeführt (**Gannon et al., 1988**). In Südamerika (Argentinien, Brasilien) wurden gesunde und durchfallkranke Ferkel sowie Ferkel, die von Ödemkrankheit betroffen waren, auf Infektionen mit STEC getestet (**da Silva et al., 2001; Parma et al., 2000**). Von insgesamt 367 Isolatn waren 21,5 % EDEC. Tiere, gleichzeitig unter Ödemkrankheit und Durchfall litten, wurden in den oben zitierten Arbeiten nicht beschrieben.

In Korea wiesen **Kwon et al. (2002)** bei an Ödemkrankheit und Durchfall erkrankten Absatzferkeln unter den *E. coli*-Isolatn in 12,2 % der Fälle EDEC nach, was mit Angaben aus dem europäischen Raum gut übereinstimmt.

Über serologische Untersuchungen auf EDEC- bzw. STEC-Infektionen bei Schweinen liegen derzeit nur sehr wenige Daten vor. **Lege (2003)** untersuchte Blutproben von Schweinen in sechs Schweinezuchtbetrieben in Deutschland mit Hilfe eines ELISA-Tests auf STEC-spezifische Antikörper. Sie konnte zeigen, dass sowohl in fünf Betrieben mit Verdacht auf Ödemkrankheit als auch in einem Betrieb ohne Ödemkrankheit bei mindestens 92 % der Muttersauen Stx2e-Antikörper vorhanden waren. Während Saugferkel kurz nach der Geburt in bis zu 30 % der Fälle Stx2e-Antikörper aufwiesen, waren solche Antikörper zum Zeitpunkt des Absetzens nur noch bei 6 % der Ferkel nachweisbar. Nach dem Absetzen stieg der Anteil seropositiver Ferkel dann wieder deutlich an, und zwar auf 40 % drei Wochen und auf 68 % sechs Wochen nach dem Absetzen. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass die Ferkel in der kritischen Lebensphase um den Absetztermin herum aufgrund ihres geringen Immunschutzes gegen das Stx2e besonders empfindlich gegenüber einer Infektion mit Ödemkrankheitserregern sind (**Lege, 2003**).

Die in so genannten "Problembetrieben" häufig wiederkehrenden Ausbrüche der Ödemkrankheit sind ein Hinweis auf die Persistenz von EDEC im Bestand (**Bertschinger and Gyles, 1994**). Dabei treten die pathogenen Erreger häufig auch in Zuchtbetrieben auf, in denen bei den Tieren keine klinischen Symptome der Ödemkrankheit nachweisbar sind (**Baljer and Franke, 1999**). EDEC treten sowohl bei gesunden als auch bei an Durchfall und/oder Ödemkrankheit erkrankten Ferkeln im Kot auf (**Aarestrup et al., 1997; Imberechts et al., 1994; Nagy et al., 1999; Niewerth et al., 2001; Osek et al., 1999; Osek, 2000b; Sojka et al., 1960; Woodward et al., 1992**).

Tabelle 3 Verbreitung und Prävalenz von *stx2e*-positiven *E. coli* mit (EDEC) oder ohne (STEC) F18-Fimbrien bei Schweinen

Untersuchte Tiere					Isolate		
Land	Alter	Vorbericht	Anzahl	Gesamt [n]	EDEC	andere STEC	Referenz
Deutschland	Saugferkel, Absetzer, Mastschwein, Sau	Durchfall	66	66	n. t.	12	Appel et al., 1989
Deutschland	Mastschwein	gesund	75	463	n. t.	16	Bülte et al., 1990
Deutschland	k. A.	gesund	120	120	n. t.	7	Beutin et al., 1993
Deutschland	Absetzer	Durchfall	k. A.	380	168	17	Wittig et al., 1995
Deutschland	Ferkel	ÖK, Durchfall	k. A.	104	25	n. t.	Niewerth et al., 2001
Deutschland	Saugferkel, Absetzer, Sau	ÖK, Durchfall	720	1604	69	3	Lege, 2003
Deutschland Schweden	k. A.	ÖK	k. A.	116	n. t.	116	Tschäpe et al., 1992
Dänemark	Absetzer	ÖK	k. A.	195	173	3	Aarestrup et al., 1997
Dänemark	4. bis 8. LW	ÖK, Durchfall	k. A.	219	35	1	Frydendahl, 2002
Norwegen	Absetzer	ÖK	k. A.	20	n. t.	14	Wasteson et al., 1992
Polen	Absetzer	ÖK, Durchfall	k. A.	418	n. t.	78	Osek et al., 1999
Polen	Absetzer	Durchfall	418	418	75	3	Osek, 1999b
Polen	Absetzer	Durchfall	82	82	16	22	Osek, 2000a
Polen	Absetzer	Durchfall	k. A.	38	9	11	Osek, 2000b
Ungarn	Absetzer	Durchfall	88	205	n. t.	17	Nagy et al., 1990

Fortsetzung Tabelle 3 und Erläuterungen auf der nächsten Seite

Tabelle 3 Verbreitung und Prävalenz von *stx2e*-positiven *E. coli* mit (EDEC) oder ohne (STEC) F18-Fimbrien bei Schweinen (Fortsetzung)

Untersuchte Tiere				Isolate			
Land	Alter	Vorbericht	Anzahl	Gesamt [n]	EDEC	andere STEC	Referenz
Ungarn	Absetzer	ÖK, Durchfall	k. A.	43	17	3	Nagy et al., 1999
Serbien	k. A.	ÖK, Durchfall, gesund	1191	k. A.	n. t.	135	Čobeljić et al., 2005
Tschechien	Ferkel	Durchfall	k. A.	451	n. t.	184	Alexa et al., 2000
England	k. A.	ÖK, Durchfall	k. A.	2321	n. t.	411	Sojka et al., 1960
England	ab 3. LW	ÖK, Durchfall	58	62	6	0	Saunders et al., 1960
England	Saugferkel, Absetzer	ÖK	k. A.	80	n. t.	35	Linggood and Thompson, 1987
England	k. A.	Durchfall	k. A.	115	n. t.	34	Woodward et al., 1992
Schweiz	k. A.	ÖK, Durchfall	86	86	n. t.	45	Boss et al., 1992
Schweiz	4. bis 12. LW	ÖK, Durchfall	50	50	37	1	Imberechts et al., 1994
Schweiz	ab 2. LW	ÖK, Durchfall	113	113	53	0	Sarrazin et al., 2000
Spanien	ab 2. LW	ÖK, Durchfall	414	1334	n. t.	51	Garabal et al., 1995
Argentinien	Ferkel	Durchfall, gesund	223	223	n. t.	8	Parma et al., 2000
Brasilien	Ferkel	ÖK	34	144	76	23	da Silva et al., 2001
Kanada	k. A.	ÖK, Durchfall	k. A.	875	k. A.	50	Gannon et al., 1988
Korea	Absetzer	ÖK, Durchfall	253	230	28	2	Kwon et al., 2002

Erläuterungen: k. A.: keine Angaben; LW = Lebenswoche; n. t. = nicht getestet; ÖK = Ödemkrankheit.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Referenz- und Kontrollstämme sind in der **Tabelle 4** aufgelistet. Außerdem wurden 1.353 *E. coli*-Stämme, die in den Jahren 2000 bis 2002 im Rahmen der bakteriologischen Diagnostik des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Giessen aus eingesendetem Probenmaterial nach Standardmethoden isoliert worden waren, in die Untersuchung einbezogen. Weiterhin standen 75 *E. coli*-Isolate zur Verfügung, die im Rahmen der Bestandsbetreuung durch den Schweinegesundheitsdienst der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Giessen in den Jahren 1997 bis 1998 isoliert worden waren (**Lege, 2003**).

Alle Stämme wurden entweder in LB-Medium mit 30 % Glycerin bei -80°C gelagert oder nach Plattenabschwemmung mit Serumbouillon (incl. 10 % Glukose) lyophilisiert und bei 4°C gelagert.

3.1.2 Impfstoffe

Insgesamt wurden drei Immunisierungsversuche an Kaninchen und Ferkeln durchgeführt. Als Impfantigen diente das Bakterienzellysat des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) oder die aufgereinigte B-Untereinheit des rekombinanten Stx2e (rHis-StxB2e). Die Charakteristika der Impfstoffe und die verabreichte Impfantigenmenge pro Tier und Impfung sind in den **Tabellen 9** und **10** aufgelistet. Die Präparation der Impfstoffe ist in den **Kapiteln 3.2.2** und **3.2.5** beschrieben.

3.1.3 Adjuvantien

Zur Herstellung polyklonaler Antisera in Kaninchen und Ferkeln wurden verschiedene Adjuvantien im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem Antigen rHis-StxB2e oder einem Placebo (physiologische Kochsalzlösung) eingesetzt. Insgesamt standen 4 Adjuvantien zur Verfügung: HL-3, ISA 266, IMS 1313 (alle über Fa. Lohmann Animal Health, Cuxhaven) sowie inkomplettes Freundesches Adjuvans (Bestell Nr. 5506, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim).

Tabelle 4 Liste der verwendeten Referenz- und Kontrollstämme

Stammbezeichnung	Spezies	relevante Eigenschaften	Herkunft	Referenz
299	<i>E. coli</i>	O139:K82, <i>stx2e</i> , <i>fedA</i>	Schwein	IHIT
987P	<i>E. coli</i>	O9:K103:H-, <i>fasA</i> , <i>estap</i>	Schwein	Wr
2324	<i>E. coli</i>	O157:H7, <i>stx2</i> , <i>eae</i>	Rind	LW
2430	<i>E. coli</i>	O116:H21, <i>stx1</i> , <i>stx2</i>	Rind	Mon
B41	<i>E. coli</i>	O101:H-, <i>fanA</i> , <i>fim41a</i> , <i>estap</i>	Rind	Wr
BL21(DE3, pHIT-IV-24)	<i>E. coli</i>	GVO, BL21(DE3/pHIT-15b:: <i>stxB2e</i>)	k. A.	F
C600	<i>E. coli</i>	rauh	Mensch	K
E57	<i>E. coli</i>	O138:K81, <i>stx2e</i> , <i>fedA</i> , <i>estap</i> , <i>estb</i>	Schwein	Wr
E32511	<i>E. coli</i>	O157:H-, <i>stx2</i> , <i>stx2c</i>	Mensch	Z
E40104/0	<i>E. coli</i>	O126:H27, <i>stx2</i>	Mensch	Sc
EDL933	<i>E. coli</i>	O157:H7, <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i>	Mensch	A
F107/86	<i>E. coli</i>	O139:K12:H1, <i>stx2e</i> , <i>fedA</i>	Schwein	Be
G7	<i>E. coli</i>	O8:K87, <i>faeG</i> , <i>elt</i> , <i>estb</i>	Schwein	Wr
Gö15III	<i>E. coli</i>	O141:K85, <i>stx2e</i> , <i>fedA</i>	Schwein	LW
R27	<i>E. coli</i>	Plasmid-Marker (112 MDa)	k. A.	T
R478	<i>E. coli</i>	Plasmid-Marker (66 MDa)	k. A.	T
RU244	<i>E. coli</i>	GVO, BL21(DE3/pHIT-II-3) = BL21(DE3/pHIT-15b:: <i>spvC</i>)	k. A.	Ba
RU254	<i>E. coli</i>	GVO, BL21(DE3, pET-15b)	k. A.	Ba
SA53	<i>E. coli</i>	<i>stx2</i>	Rind	Mos
TTP-1	<i>E. coli</i>	O157:H-, <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i>	Mensch	LW
V517	<i>E. coli</i>	Plasmid-Marker (1,4/1,8/2,0/2,6/3,4/3,7/4,8/35,8 MDa)	k. A.	T
X-109/97	<i>E. coli</i>	Plasmid-Marker (12,5 MDa)	k. A.	HW
STm	<i>S. Typhimurium</i>	Plasmid-Marker (60 MDa)	k. A.	D

Erläuterung: **A** = American Type Culture Collection, Virginia, USA; **Ba** = R. Bauerfeind, IHIT; **Be** = H.U. Bertschinger, Institut für Veterinärbakteriologie, Universität Zürich, Schweiz; **D** = U. Dinjus, BgVV Jena; **F** = S. Franke, IHIT; **GVO** = Gentechnisch veränderte Mikroorganismen; **H** = R. Helmuth, BgVV, Berlin; **HW** = H. Willems, IHIT; **IHIT** = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Giessen; **K** = H. Karch, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universitätsklinikum Münster; **LW** = L.H. Wieler, IHIT; **Mon** = Montenegro et al., 1990; **Mos** = Moseley et al., 1982; **S.** = *Salmonella enterica* Subspezies *enterica*; **Sc** = S. Scotland, Division of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, London, England; **T** = H. Tschäpe, BgVV, Wernigerode; **Wr** = C. Wray, Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, England; **Z** = K. Ziebell, Guelph, Canada.

3.1.4 Tiere

Kaninchen. Es wurden insgesamt elf 4 bis 6 Wochen alte weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer (Fa. Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln oder Fa. Charles River Deutschland GmbH, Kißlegg) zur Herstellung von Immunseren verwendet.

Schweine. 1.841 Plasmaproben stammten von Zuchtsauen aus Südhessen, deren Betriebe 1997 dem Schweinegesundheitsdienst des ehemaligen Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamtes Frankfurt (jetzt Landesbetrieb Hessisches Landeslabor) angeschlossen waren. Die Proben wurden zwischen Februar und August 1997 entnommen. Das Alter der Tiere betrug zwischen 2 und 5 Jahren. Die Betriebe waren randomisiert unter den südhessischen Ferkelerzeugerbetrieben ausgewählt worden. Dabei wurde von einer 70 %-igen Prävalenz seropositiver Betriebe ausgegangen. Die Anzahl der je Betrieb beprobten Tiere richtete sich nach der Herdengröße. Dabei sollte mit 95 %-iger Sicherheit bei einer angenommenen Prävalenz von 5 % wenigstens ein positives Tier erfasst werden. Parallel wurden zu diesen Schweinen tier- und betriebsspezifische Parameter mit einem Fragebogen dokumentiert (**Damriyasa, 2001**).

Zusätzlich wurden 30 Ferkel zur Herstellung von Immunseren verwendet. Das Alter der Tiere betrug zwischen 2 und 4 Wochen.

Weitere 257 Serumproben wurden von Schweinen gewonnen, die zum Zeitpunkt der Probennahme zwischen 1997 bis 2000 Patienten der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Giessen waren oder als Schlachtschwein am Schlachthof Giessen angeliefert worden waren.

3.1.5 Blut- und Serumproben

Blutproben bei Kaninchen wurden aus der *Vena auricularis caudalis* entnommen, bei Schweinen aus der *Vena cava cranialis*. Blutproben von Schlachtschweinen wurden beim Entbluten der Tiere genommen. Als Probengefäß dienten Probenröhrchen mit oder ohne EDTA-Beschichtung. Nach einer Inkubation von 60 min bei RT wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 3.000 x g, RT) und das Serum bzw. Plasma gewonnen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C bzw. -70°C.

Es wurden sieben Schweinehyperimmunseren gegen Stx2e zur Überprüfung des rHis-StxB2e-ELISA eingesetzt. Diese Serumproben stammten von Schweinen, die wiederholt mit glutaraldehydinaktivierten Kulturüberständen von Stx2e-exprimierenden *E. coli*-Stämmen immunisiert worden waren (**Alexa et al., 1998**).

3.1.6 Monoklonale Antikörper

Die verwendeten monoklonalen Antikörper sind in der **Tabelle 5** aufgelistet.

3.1.7 Konjugate

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konjugate sind in der **Tabelle 6** aufgelistet.

3.1.8 Oligodesoxyribonukleotide

Die verwendete Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) und der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen und sind in der **Tabelle 7** aufgelistet. Sie wurden mit A. dest. auf 100 µM (pET-, ECW 1-2-, sowie Bosworth-PCR-Primer) oder 20 µM (*stxB2e*-PCR-Primer) eingestellt. Zur Überprüfung der Konzentration wurden die Oligodesoxyribonukleotide 1:100 mit A. dest. verdünnt und ihre optische Dichte (OD) mittels Photometer (**Kapitel 3.3.2**) bei Wellenlängen von 260 und 320 nm gemessen. Zur Berechnung der DNS-Konzentration wurde die folgende Formel eingesetzt:

- 1) DNS-Konzentration [ng/µl] = $(OD_{260nm} - OD_{320nm}) \times 33 \times \text{Verdünnung}$
- 2) DNS-Konzentration [pmol/µl] = $(\text{ngDNS}/\mu\text{l} \times 1000) / (309 \times \text{Primerlänge})$

Schließlich wurden die Oligodesoxyribonukleotide bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.1.9 Zelllinien

Für die Untersuchung auf Stx2-neutralisierende Antikörper wurden Verozellen verwendet. Diese adhärente Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC Nr. CRL 1587; LGC-Promochem GmbH, Wesel) bezogen und stammt ursprünglich von Nierenkarzinomzellen der grünen Meerkatze.

Tabelle 5 Übersicht über die verwendeten monoklonalen Antikörper

Bezeichnung	Art des Materials	Gebrauchs-verdünnung	Spezifisches Antigen	Herkunft / Referenz
5G10	ZKÜ	unverdünnt	StxB2e	Franke, IHIT
BC5 BB12	Aszites	1:100	StxB2	Downes et al., 1988
13C4	ZKÜ	1:33,3	StxB1	Strockbine et al., 1985
1E8	ZKÜ	unverdünnt	Alphatoxin von <i>Clostridium perfringens</i>	Schoepe, IHIT

Erläuterungen: ZKÜ = Zellkulturüberstand

Tabelle 6 Übersicht der verwendeten Konjugate

Konjugat-Name	Gebrauchs- konzentration	Bestell-Nr.	Firma
Ni ²⁺ -NTA-Meerrettich-Peroxidase	1:2.000	34530	Qiagen, Hilden
Esel-anti-Kaninchen-Ig-Meerrettich-Peroxidase	1:10.000	NA 934	Amersham, Freiburg
Schaf-anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase	1:2.000	NXA 931	Amersham, Freiburg
Ziege-anti-Schwein-IgG-Meerrettich-Peroxidase	1:6.000	114-035-003	Dianova, Hamburg

Tabelle 7 Übersicht über die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide

PCR-Type	Primer ²⁾	Sequenz (5' → 3')	Lokalisation		Referenz	
			Position ¹⁾	Gen/Region	Datenbank	Datenbank Nr.
Bosworth	<u>F18-1</u>	TGGTAACGTATCAGCAACTA	246-558	<i>fedA</i>	GenBank	M61713
	<u>F18-2</u>	ACTTACAGTGCTATTTCGACG				
Bosworth	<u>F41-1</u>	AGTATCTGGTTCAGTGATGG	137-748	<i>fim41a</i>	GenBank	M21788
	<u>F41-2</u>	CCACTATAAGAGGTTGAAGC				
Bosworth	<u>K88-1</u>	GAATCTGTCCGAGAAATATCA	555-1053	<i>faeG</i>	GenBank	M25302
	<u>K88-2</u>	GTTGGTACAGGCTTTAATGG				
Bosworth	<u>K99-1</u>	AATACCTTGTTCAGGGAGAAA	488-717	<i>fanA</i>	GenBank	X05797
	<u>K99-2</u>	AACCTTGTGGTTAACTTCCT				
Bosworth	<u>LT-1</u>	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	65-336	<i>elt</i>	GenBank	M17873
	<u>LT-2</u>	TGGTCTCGGTCAGATATGT				
Bosworth	<u>P987-1</u>	AAGTTACTGCCAGTCTATGC	377-785	<i>fasA</i>	GenBank	M35257
	<u>P987-2</u>	GTAACCTCCACCGTTTGTATC				
Bosworth	<u>STaP-1</u>	CAACTGAATCACTTGACTCTT	356-513	<i>estap</i>	GenBank	M58746
	<u>STaP-2</u>	TTAATAACATCCAGCACAGG				
Bosworth	<u>STb-1</u>	TGCCCTATGCATCTACACAAT	502-614	<i>estb</i>	GenBank	M35586
	<u>STb-2</u>	CTCCAGCAGTACCATCTCTA				
Bosworth	<u>Stx2e-1</u>	AATAGTATACGGACACGGAT	359-1091	<i>stxA2</i>	GenBank	M21534
	<u>Stx2e-2</u>	TCTGACATTTCTGGTTGACTC				
ECW 1-2	<u>ECW 1</u>	TGCGGCACAAACAGCGCGGA	548-1176	<i>eaeA</i>	GenBank	M58154
	<u>ECW 2</u>	CGGTCGCCGCCACAGGATTC				
pET	<u>pET-A</u>	GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	251-490	pET-15b	Fa. Novagen	pET-15b
	<u>pET-B</u>	CCCGCGAAATTAATACGACTCAC				
<i>stxB2e-A</i>	<u>ESE 1</u>	CAGGACGGTCTCTGCGCGGATTGTGCTAAAGGTAA	1266-1474	<i>stxB2e</i>	GenBank	M21534
	<u>ESE 4</u>	GACGACAGCGCTGTTAAACTTCACCTGGGCAA				
<i>stxB2e-B</i>	<u>ESE 6</u>	GTCCTGCATATGGCGGATTGTGCTAAAGGTAA	1271-1474	<i>stxB2e</i>	GenBank	M21534
	<u>ESE 9</u>	GCTGCTGGATCCGTTAAACTTCACCTGGGCAA				

Erläuterung: 1) Die Positionsangaben folgen den Nummerierungen und Angaben der Datenbankeinträge.

2) Die Gegenstrang-Primer sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

3.2 Bakteriologische Methoden

3.2.1 Standardanzucht von Bakterien

Bakterien wurden in dem jeweiligen Nährmedium aerob für 12 - 16 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator Modell 3032 bzw. 3033 (Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) mit 180 rpm angezüchtet.

3.2.2 Anzucht von transformierten *E. coli*-Bakterien

Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3, pHIT-IV-24) wurde entsprechend der Standardanzucht in LB-Medium unter Zugabe von Carbenicillin (Endkonzentration 50 µg/ml Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) kultiviert.

Induktion transformierter *E. coli*-Zellen. Zur Herstellung des rekombinanten Proteins rHis-StxB2e wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3, pHIT-IV-24) wie oben beschrieben angezüchtet, 1:100 (v/v) mit frischem LB-Medium mit Carbenicillin verdünnt und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,4 bis 0,5 weiterinkubiert. Zur Induktion wurde dann IPTG (Endkonzentration 0,5 mM, Fa. Biomol, Hamburg) zugegeben und die Kultur für weitere 5 h inkubiert.

3.2.3 Nachweis von Hämolyse

Der Nachweis der Hämolyse erfolgte phänotypisch. Hierfür wurden die *E. coli*-Isolate auf Schafblutagarplatten angezüchtet, inkubiert (aerob, 12 - 16 h, 37°C) und anschließend makroskopisch beurteilt.

3.2.4 O-Antigenbestimmung der *E. coli*-Isolate

Die O-Antigenbestimmung der *Escherichia coli*-Isolate erfolgte durch Objektträgerschnellagglutination mit polyvalenten Testseren (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin BgVV, Dessau). Die Testseren besaßen die folgenden Spezifitäten: O8:K87, O138:K81, O139:K82, O141:K85ab, O141:K85ac, O147:K89, O149:K91 und O157:K-. Als Negativkontrolle wurde NaCl-Lösung mitgeführt. Nach leichtem Schwenken des Objektträgers (bis 15mal) wurden die Agglutinationsreaktionen ausgewertet. Stämme, die mit keinem oder mit zwei und mehr der verwendeten Testseren reagierten, wurden als nicht typisierbar "n. t." eingestuft.

3.2.5 Präparation von Bakterienlysat

Die transformierten *E. coli*-Bakterien (Ausgangsvolumen 1.000 ml) wurden nach der Induktion (siehe **Kapitel 3.2.2**) durch Zentrifugation (20 min, 7.410 x g, 4°C) gewonnen und in 20 ml eiskaltem 1 x in PBS resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French-Presse (French® Pressure Cell, Modell FA-030, Fa. SLM-Aminco, Rochester, NY, USA) bei 20.000 bar und eine Flussrate von ca. 3 ml/min. Nach Zentrifugation (20 min, 12.000 x g, 4°C; Zentrifuge Modell RC5B, Rotor SS34, Fa. Sorvall® DuPont, Bad Homburg) wurde das Sediment in 20 ml Lyse-Puffer resuspendiert und die Suspension für 60 min bei 37°C unter

Schütteln inkubiert. Nach Ultrazentrifugation (60 min, 100.000 x g, 4°C, Ultrazentrifuge L8-55, Rotor Ti 75, Fa. Beckman, München) wurde der Überstand gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 DNS-Präparation

Plasmid-DNS. Die Plasmid-DNS wurde nach der Methode von **Kado and Liu (1981)** gewonnen. Nach Standardanzucht der zu untersuchenden Bakterien wurden 1,5 ml der Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde zentrifugiert (4 min, 12.000 x g). Das Sediment wurde in 20 µl TE-Puffer-2 resuspendiert, mit 100 µl Lysepuffer versetzt und für 25 min bei 58°C inkubiert. Das Lysat wurde mit 100 µl frisch angesetzter Phenol-Chloroform-Lösung (v/v) versetzt, gut gemischt und für 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 90 µl vom Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Genomische DNS. 50 µl einer Bakterienkultur nach Standardanzucht wurden mit 100 µl A. dest. versetzt und für 10 min bei 100°C inkubiert. Der Überstand wurde in der pET-PCR (**Kapitel 3.3.4**) eingesetzt.

3.3.2 Bestimmung der DNS-Konzentration

Die DNS-Konzentration wurde durch photometrische Messung bei 260 und 320 nm bestimmt (DU® 640 Spectrophotometer, Fa. Beckman, Frankfurt). Dazu wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\text{DNS-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = (\text{OD}_{260\text{nm}} - \text{OD}_{320\text{nm}}) \times 50 \times \text{Verdünnung}$$

3.3.3 DNS-Aufreinigung

Natriumperchlorat-Fällung. PCR-Amplifikate wurden mit 1 M NaClO₄ und Isopropanol im Verhältnis 1:1:1 [v/v/v] gemischt und zentrifugiert (20 min, 20.000 x g, RT). Das DNS-haltige Sediment wurde in 100 µl eiskaltem Ethanol (70 %) resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation (5 min, 20.000 x g, RT) das Sediment unter Vakuum getrocknet. Die DNS wurde in 10 µl A. dest. aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Ethanol-Fällung. Zu 20 µl PCR-Amplifikat wurden 80 µl A. dest., 11 µl einer 3 M Natriumacetat Lösung (pH 7,0) und 300 µl 99 % iges Ethanol gegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und für 30 min bei 15.800 x g zentrifugiert. Das DNS-haltige Sediment wurde in 300 µl 70 % igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min, 15.800 x g, RT) und unter Vakuum getrocknet. Schließlich wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

pET-PCR. Ein 20 µl-Reaktionsansatz enthielt 1 x *Tfl*-PCR-Puffer (Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf), 0,25 U *Tfl*-Polymerase, Primer (pET-A, pET-B) in einer Endkonzentration von 1 µM und Nukleotide in einer Endkonzentration von 200 µM je Nukleotid. Als Matrize wurden 5 µl einer frisch hergestellten Genom-DNS-Lösung dem Reaktionsansatz zugegeben.

ECW 1-2 PCR. Das Reaktionsgemisch dieser PCR entsprach bis auf die folgenden Änderungen dem der pET-PCR: Primer (ECW 1, ECW 2) in einer Endkonzentration von 0,625 ng und Nukleotide in einer Endkonzentration von 50 µM je Nukleotid. Es wurden ca. 10⁵ Bakterienzellen dazugegeben.

Bosworth-PCR. Die PCR wurde nach dem Prinzip der Multiplex-PCR durchgeführt. Der 30 µl-Reaktionsansatz enthielt, 1 x NH₄-Mix, 2 mM MgCl₂, 0,9 U PanScript DNS Polymerase (Fa. PAN Systems GmbH, Nürnberg), 0,5 µM von jedem Primer (**Tabelle 7**) und 133 µM Nukleotid. Als DNS-Probe wurden ca. 10⁵ Bakterienzellen (suspendiert in *A. dest.*) zugegeben.

stxB2e-PCR (A + B). Der Reaktionsansatz bei dieser PCR entsprach bis auf die folgende Änderung dem Gemisch der ECW 1-2 PCR: es wurden 0,6 µM von jedem der beiden Primer (**Tabelle 7**) zugegeben.

Als Positivkontrollen dienten bei der pET-PCR die GVOs RU 244 und RU 254, bei der ECW 1-2 PCR der *E. coli*-Stamm TTP-1, bei der Bosworth-PCR die *E. coli*-Stämme B41, 987P, E57, G7, und bei der stxB2e-PCR (A + B) der *E. coli*-Stamm E57 und der GVO-Stamm BL21(DE3, pHIT-IV-24). Als Negativkontrolle wurde bei allen PCR-Verfahren *A. dest.* anstelle der Bakteriensuspension eingesetzt.

Alle Reaktionsansätze wurden mit 20 µl sterilem Mineralöl (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überschichtet und die Kettenreaktion entsprechend den in der **Tabelle 8** aufgeführten Parametern in den Thermocyclern Mastercycler 5330 (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) oder Perkin Elmer Cetus (Fa. Perkin Elmer, Überlingen) durchgeführt.

Tabelle 8 Parameter der durchgeführten PCR-Reaktionen

PCR-Typ	Zyklus	Reaktionsbedingungen			Thermocycler-Typ
		Denaturierung	Anlagerung	Verlängerung	
pET	1.	94°C / 9 min	-	-	Mastercycler 5330
	2. - 30.	94°C / 15 sec	57°C / 30 sec	72°C / 60 sec	
	31.	-	-	72°C / 7 min	
ECW 1-2	1.	94°C / 5 min	-	-	Perkin Elmer Cetus
	2. - 31.	94°C / 60 sec	64°C / 90 sec	72°C / 90 sec	
	32.	-	-	72°C / 5 min	
Bosworth	1.	94°C / 5 min	-	-	Perkin Elmer Cetus
	2. - 31.	94°C / 60 sec	55°C / 60 sec	72°C / 90 sec	
	32.	-	-	72°C / 5 min	
<i>stxB2e</i> (A + B)	1.	94°C / 5 min	-	-	Perkin Elmer Cetus
	2. - 30.	94°C / 60 sec	53°C / 60 sec	72°C / 60 sec	
	31.	-	-	72°C / 5 min	

3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von PCR-Amplifikaten und Plasmiden erfolgte in horizontalen Flachbettgelen mit 0,5 bis 2 % Agarose (Fa. Pronadisa, Laboratorios Conda S.A., Madrid, Spanien über Fa. MAGV, Rabenau-Londorf) und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid bei PCR-Produkten. Die Durchführung erfolgte bei ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand mit 1 x TAE als Laufpuffer für ein bis 16 Stunden. Der Probenauftrag erfolgte nach Versetzen des DNS-Gemisches mit 6 x Loading-Puffer. Als Molekulargewichtsmarker wurde die 1-Kb-Leiter, BioLadder™ 100 (Fa. Hybaid GmbH, Heidelberg) oder der GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fa. MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) mitgeführt. Zur Größenbestimmung der Plasmide wurden die Plasmide der Referenzstämme (**Tabelle 4**) eingesetzt. Die Visualisierung der Plasmid-DNS erfolgte durch Einlegen der Gele in ein Ethidiumbromid-Bad (Konzentration 1 µg/ml, 20 min) und die anschließende Durchleuchtung der Gele mit UV-Licht (320 nm, Gerät 2011 Macrovue Transluminator, Fa. LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden).

3.3.6 DNS-Sequenzierung

Zur DNS-Sequenzierung wurden ausschließlich aufgereinigte PCR-Amplifikate eingesetzt. Dazu wurden die PCR-Amplifikate mit Natrium-Perchlorat (**Kapitel 3.3.3**) gefällt. Nach Bestimmung der DNS-Konzentration (**Kapitel 3.3.2**) wurden in der Sequenzierungs-PCR dann pro 100 bp zu sequenzierendes Amplifikat 7 ng DNS eingesetzt. Der 20 µl-Reaktionsansatz enthielt neben der DNS außerdem 0,24 µM Primer und 8 µl eines Reaktionsgemisches bestehend aus farblich markierten Nukleotiden, Polymerase und Puffer (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit, Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Kettenreaktion wurde in dem Thermocycler PCR System 9600 (Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt) nach folgendem Programm durchgeführt:

initiale Denaturierung 96°C, 2 min

Zyklus (Anzahl der Zyklen: 25)

1) Denaturierung	96°C,	10 sec
2) Anlagerung der Primer	50°C,	5 sec
3) Verlängerung der Primer	60°C,	4 min

Die so erzeugten Fragmente wurden mit einer Phenol/Chloroformextraktion sowie einer alkoholischen Fällung (**Kapitel 3.3.3**) isoliert und über ein vertikales 6,5 % iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ablesung des Bandenmusters und die Übersetzung in Nukleotidsequenzen erfolgte mit einem Sequenziergerät Modell 373A (Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt).

3.4 Zellkulturverfahren

3.4.1 Kultivierung von Zellen

Die Verozellen (ATCC Nr. CRL-1587; LGC-Promochem GmbH, Wesel) wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (200 ml, Fa. Nunc, Wiesbaden) unter Zellkultur-Brutschrankbedingungen (37°C, 72 - 96 h, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung) kultiviert. Als Nährmedium wurde Zellkulturmedium 1 verwendet. Zum Ernten der Zellen wurden Mediumreste durch Spülen der Flaschen mit HEPES-Puffer entfernt. Nach Zugabe von 10 ml Trypsinlösung (0,25 %) und EDTA-Puffer erfolgte eine Inkubation für 10 bis 15 Minuten im Brutschrank (37°C). Die dadurch abgelösten Zellen wurden zentrifugiert (20°C, 7 min, 202 x g) und das Sediment in 5 ml Zellkulturmedium 1 resuspendiert. Ein Aliquot (20 µl) wurde 1:10 (v:v) mit Trypanblau-Lösung versetzt. Die Bestimmung der Anzahl lebender Verozellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die für den jeweiligen Test erforderliche Zelldichte wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium 1 eingestellt.

3.4.2 Stx2e-Neutralisationstest

Die Bestimmung von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern in Serumproben von Schweinen wurde auf Verozellen nach der modifizierten Methode von **Gentry and Dalrymple (1980)**, durchgeführt. Hierzu wurden die Serumproben durch Inkubation für 30 min bei 56°C inaktiviert und dann 1:20 (v/v) mit Zellkulturmedium 1 verdünnt. Nach Zentrifugation (7 min, 15.800 x g, RT) wurden 50 µl/Napf der Serumproben in einer 96-F-Loch-Nunclon™ D-Mikrotiterplatte (Bestell Nr. 167008, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 50 µl/Napf einer Stx2e-Lösung pipettiert und für 1 h bei RT präinkubiert. Danach wurden 4 x 10⁴ Verozellen in 50 µl Zellkulturmedium 1 pro Napf zugegeben und die Ansätze für 96 h bei 37°C und mit 5 % iger CO₂-Spannung inkubiert. Anschließend wurden zur Bestimmung der Vitalität der Zellen jedem Ansatz 125 µg MTT (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 1 x PBS zugegeben und die Reaktionsansätze unter Schwenken für 4 h bei 37°C inkubiert (**Tada et al., 1986**). Die entstandenen Farbkristalle wurden dann mit 100 µl/Napf einer SDS-Lösung (10 % SDS (w/v) in 0,01 N HCl) über 12 - 16 h bei 37°C und unter leichtem Schwenken gelöst. Zur Prüfung wurde in dem Test eine wässrige Stx2e-Gebrauchslösung mit der Konzentration von 4 CD₅₀/50 µl eingesetzt. Die Lösung war durch Ultraschall-Lyse von Bakterien des *E. coli*-

Stammes 299 hergestellt worden. Hierzu waren diese zuvor über Nacht unter Standardbedingungen frisch angezüchtet und mittels Zentrifugation geerntet worden. Zur groben Reinigung wurde das Ultraschall-Lysat zentrifugiert (100.000 x g, 4°C; 2 h) und danach bis zur weiteren Verwendung aliquotiert bei -70°C eingefroren. Die Quantifizierung des in dieser Lösung enthaltenen Stx2e erfolgte durch Endpunkttitration des Stx2e-vermittelten zytotoxischen Effektes auf Verozellen.

Alle Serumproben wurden im Dreifachansatz mit bzw. ohne Stx2e getestet. Als Positivkontrolle wurde der Stx-neutralisierende, monoklonale Antikörper BC5 BB12 sowie SDS (1 % (w/v) in NaCl-Lösung) verwendet. Als Negativkontrolle dienten die monoklonalen Antikörper 13C4 und 1E8 (**Tabelle 5**) sowie Zellkulturmedium 1. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Reaktionsansätze mit einem Plattenphotometer durch Differenzmessung der Testwellenlänge OD₅₄₀ und der Referenzwellenlänge OD₆₉₀ (OD = OD₅₄₀ - OD₆₉₀). Die absolute optische Dichte (OD_{abs}) der Proben und Kontrollen erfolgte durch die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Ansätze:

$$OD_{abs} = [OD_{Ansatz\ 1} + OD_{Ansatz\ 2} + OD_{Ansatz\ 3}] / 3.$$

Die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen wurde in Bezug zur Positiv- (OD_{pos}) und Negativkontrolle (OD_{neg}) in der jeweiligen Mikrotiterplatte angegeben. Dabei diente die folgende Formel zur Ermittlung der relativen optischen Dichte:

$$OD_{rel} [in\ \%] = [(OD_{abs} - OD_{pos}) / (OD_{neg} - OD_{pos})] \times 100.$$

Der Stx2e-Neutralisationstiter eines Serums wurde dann wie folgt errechnet:

- 1) $OD_{rel} \text{ Serumproben} - OD_{rel} \text{ monoklonaler Antikörper 13C4} = OD_{rel} \text{ Serumprobe}$
- 2) $\text{Stx2e-Neutralisationstiter [Std.}_{NT} \%] =$
 $(OD_{rel} \text{ Serumproben} / OD_{rel} \text{ monoklonaler Antikörper}_{BC5\ BB12}) \times 100$

Der Grenzwert für die Unterscheidung zwischen serologisch positiven und negativen Serumproben wurde bei 50 Std._{NT} % gesetzt.

3.5 Proteinanalytische Methoden

3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in wässrigen Lösungen erfolgte mit dem "Protein Assay Reagent" (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach der Methode von **Bradford (1976)**, gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die Proben wurden jeweils im Dreifachansatz in Einmal-Plastikküvetten (Bestell Nr. 759015, Fa. Fischer, Frankfurt) mit dem "Protein Assay Reagent" gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die optische Dichte des Reaktionsansatzes wurde bei 595 nm in einem Photometer Modell Uvikon® 810 (Fa. Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz) bestimmt. Die Auswertung wurde anhand einer Albumin-Standardkurve (Konzentrationsbereich von 0,035 bis 1,400 mg/ml) berechnet.

3.5.2 Affinitätschromatografische Aufreinigung an einer Ni²⁺-NTA-Matrix

Die Aufreinigung des rHis-StxB2e-Proteins erfolgte an einer Nickel-Chelat-Säule (Ni²⁺-NTA-Superflow-Matrix, Fa. Qiagen GmbH, Hilden). Dazu wurden 3 ml aufgeschüttelte Superflow-Matrix-Suspension in eine Plastiksäule luftfrei gepackt und die Säule an eine FPLC[®]-Anlage (Fa. Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Schweden) angeschlossen. Die Säule wurde dann bei einer Flussrate von 1 ml/min mit Lyse-Puffer äquilibriert. Unter Verwendung einer Superloop-Probenauftragsschleife (Fa. Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala Schweden) wurde das Bakterienlysats (**Kapitel 3.2.5**) auf die Säule gegeben. Nicht gebundenes Protein wurde anschließend mit Waschpuffer entfernt bis der Durchfluss eine OD_{280nm} von 0 erreicht hatte. Anschließend wurde das Fusionprotein mit Elutionspuffer eluiert und in 12 Fraktionen à 2 ml aufgefangen. Fraktionen, die einen hohen Gehalt an rHis-StxB2e enthielten, wurden zusammengefasst, aliquotiert (à 1 ml) und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.5.3 Tricine-SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der von **Schägger and von Jagow (1987)**, beschriebenen Methode. Die Tricine-SDS-PAGE wurde in 4 %-igen Sammelgelen und 10 %-igen Trenngelen unter reduzierenden Bedingungen in einer Vertikalelektrophorese-Kammer Modell Minigel-Twin Typ G42 (Fa. Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die Trenngele hatten eine Größe von 8,5 x 6,5 cm und eine Dicke von 1 mm. Die Proben wurden 1:1 (v/v) mit Proteinprobenpuffer gemischt, 5 min bei 100°C aufgeköcht und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer elektrischen Spannung von 100 V gestartet. Nach Eintritt der Farbstofffront in das Trenngel erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 120 V über 2 h (Netzgerät: Modell 3000/300 Power Supply, Fa Bio-Rad GmbH, München). Als Molekularmassenmarker wurde der SeeBlue™ Pre-Stained Standard (Fa. Novex, San Diego, USA) mitgeführt. Die Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteinfractionen erfolgte mit einer Tricine-Coomassie-Färbung. Dazu wurde das Trenngel 30 min in Fixierlösung inkubiert, in Färbelösung 16 - 18 h gefärbt und abschließend nicht gebundener Farbstoff durch Entfärben in 10 % iger Essigsäure entfernt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele auf Gel-Blotting-Papier (GB002, Bestell Nr. 426693, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) aufgezogen und unter Vakuum für 2 h bei 80°C in einem Gelrockner Modell Gel Dryer 543 (Fa. Bio-Rad, München) getrocknet.

3.6 Serologische Methoden

3.6.1 Westernblot-Verfahren

Proteintransfer. Proteine wurden mittels Tricine-SDS-PAGE aufgetrennt (**Kapitel 3.5.3**) und unter Verwendung des Semi-Dry-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran (Typ Protran[®] BA 85, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert (**Burnette, 1981; Kyhse-Andersen, 1984**). Dazu wurden 18 Filterpapiere (GB002, Bestell Nr. 426693, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) und eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Auf die untere Graphit-Anode einer Elektroblokkammer Typ 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit

(Fa. Pharmacia, Freiburg) wurden 6 in Anodenpuffer I und 3 in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere gelegt. Dann wurden die mit 1 x PBS getränkte Nitrozellulose-Membran, das kurz in Anodenpuffer II äquilibrierte Tricine-SDS-PAGE-Gel und die 9 mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere aufgeschichtet. Nach Einlegen der oberen Graphit-Kathode erfolgte der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gel für 90 min. Nach dem Blotten wurde der Erfolg des Transfers durch Färben des Gels mit Tricine-Coomassie-Färbung überprüft. Die Membran wurde bei 4°C in 1 x PBS aufbewahrt.

Detektion der Proteine. Nach dem Blocken mit 20 ml 1 % BSA (w/v) in PBS-Tween (1 h, RT) wurde der Blot dreimal mit 20 ml PBS-Tween (je 5 min, RT) gewaschen. Es folgte die Zugabe der Primärantikörper [monoklonaler Antikörper 5G10 (unverdünnt, Hybridomüberstand) oder Kaninchenserumproben (1:10.000 in PBS-Tween verdünnt)]. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper (10 ml, 1 h, RT) wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und das entsprechende Konjugat (**Tabelle 6**) zugegeben (10 ml, verdünnt in PBS-Tween, 1 h, RT). Anschließend wurde der Blot zweimal mit PBS-Tween und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Dann wurde die Substratlösung 1 (10 ml, RT) zugegeben und die Enzymreaktion nach deutlichem Sichtbarwerden der Banden durch Waschen mit A. dest. gestoppt. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken in Kunststoffschalen.

Der Nachweis von Histidin-markierten Proteinen entsprach bis auf folgende Änderungen der oben beschriebenen Methode: anstelle des Primärantikörpers wurde Ni²⁺-NTA-Meerrettich-Peroxidase (1:2.000 in PBS-Tween verdünnt, 10 ml) zugegeben und die Membran inkubiert (1 h, RT). Anschließend wurde der Blot dreimal mit 1 x PBS gewaschen (20 ml, je 5 min, RT) und in Substratlösung 2 (10 ml, RT) inkubiert.

3.6.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (rHis-StxB2e-ELISA)

Der Nachweis von Anti-Stx2e-Antikörpern in Serumproben wurde mittels ELISA geführt. Als feste Phase dienten Nunc-Immuno™ Plates (Polysorb 96-U-Platten, Bestell-Nr. 475434, Fa. Nunc, Wiesbaden), die mit 400 ng rHis-StxB2e / 100 µl Coating-Puffer / Napf bzw. nur mit 100 µl Coating-Puffer durch Inkubation für 1 h bei 37°C beschichtet wurden. Es folgte das Blocken durch Inkubation von 200 µl PBS-Tween pro Napf (1 h, 37°C). Anschließend wurden die Serumproben (1:100 in PBS-Tween, 100 µl / Napf, 90 min, 37°C) zugegeben. Alle Serumproben wurden im Dreifachansatz sowohl in mit rHis-StxB2e beschichteten als auch nur mit Coating-Puffer beschichteten Näpfen getestet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch die Zugabe des entsprechenden Konjugates (**Tabelle 6**) verdünnt in PBS-Tween (Inkubation 1 h, 37°C). Nach allen Schritten wurden die Platten jeweils dreimal mit 200 µl PBS-Tween für 5 min bei RT auf einem Mikrotiterplattenschüttler Modell Titermax 100 (1.200 rpm, Fa. Heidolph, Deutschland) gewaschen. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 100 µl / Napf ABTS-Substratlösung (5 mg ABTS in 10 ml Substratpuffer und Zugabe von 5 µl H₂O₂). Die Platten wurden dann bei 37°C inkubiert, bis das Positivkontrollserum die gewünschte optische Dichte erreichte. Die Bestimmung der optische Dichte erfolgte in einem Plattenphotometer (Typ Multiscan Ascent-Photometer, Fa. Labsystems Oy, Helsinki, Finnland) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Für den Null-Wert (Blank) wurden drei Näpfe in den ersten vier Inkubationsschritten nur mit 100 µl PBS-Tween / Napf und dann mit ABTS-Substratlösung belegt.

Als interne Referenz wurden bei der Untersuchung von Schweineserumproben auf jeder Platte mitgeführt: ein Negativkontrollserum (Serumnummer R-1382/00), welches in Vorversuchen einen niedrigen Antikörpertiter gegen das rHis-StxB2e-Antigen gezeigt hatte, sowie ein Positivkontrollserum, welches durch Mischen zweier hochtitrigen Serumproben [Verhältnis 1:1 (v/v)] von zwei Schweinen, die an Ödemkrankheit erkrankt waren, hergestellt worden war. Die Auswertung der Platten erfolgte, wenn das Positivkontrollserum eine OD₄₀₅ zwischen 1,3 und 1,4 erreicht hatte.

Bei der Untersuchung von Kaninchenserumproben wurde ein Positivkontrollserum (Serumnummer R-1368/00), welches in dem Immunisierungsversuch Nr. 1 gewonnen worden war, mitgeführt.

Der Serum-IgG-Titer [Std. %] von Schweineserumproben wurde wie folgt errechnet:

1. Blankabzug:

$$OD_{\text{Serum } xy} - OD_{\text{Blank}} = OD_{\text{Serum}'xy}$$
2. Arithmetische Mittelwerte der Messwerte:

$$OD_{\text{Serum}'xy} \text{ je Dreifachansatz berechnen (Mittelwert } 1_{\text{Serum } xy}).$$
3. Interassay-Standardisierung:

$$\text{Mittelwert } 1_{\text{Serum } xy} \times (1,3/\text{Mittelwert}_{\text{posKo}}) = \text{Mittelwert } 2_{\text{Serum } xy}$$
4. Abzug Hintergrund-Bindung:

$$\text{Mittelwert } 2_{\text{Serum } xy+\text{Ag}} - \text{Mittelwert } 2_{\text{Serum } xy-\text{Ag}} = \text{Mittelwert } 3_{\text{Serum } xy}$$
5. Abzug 50 % Negativkontrollserum:

$$\text{Mittelwert } 3_{\text{Serum } xy} - (\text{Mittelwert } 3_{\text{NegKo}} \times 0,5) = \text{Mittelwert } 4_{\text{Serum } xy}$$
6. Titerberechnung als % vom Positivkontrollserum:

$$(\text{Mittelwert } 4_{\text{Serum } xy} / \text{Mittelwert } 4_{\text{posKo}}) \times 100 = \text{Titer [Std. \%]}$$

Der Serum-IgG-Titer [Std. %] von Kaninchenserumproben wurde wie folgt errechnet:

Titer in Reaktion [%] zum Standard-Positivkontrollserum:

$$\text{Serum-IgG-Titer [Std. \%]} = (\text{Mittelwert}_{\text{Serum } xy} / \text{Mittelwert}_{\text{posKo}}) \times 100$$

Die Grenzwerte für die serologische Einteilung im rHis-StxB2e-ELISA sind in der **Tabelle 14** aufgelistet.

3.7 Immunisierungsverfahren

Tiere. Die für die Tierexperimente verwendeten Kaninchen und Ferkel sind im **Kapitel 3.1.4** aufgeführt.

Impfpläne. Mit dem rHis-StxB2e-Antigen wurden insgesamt drei Immunisierungsversuche an Kaninchen und Schweinen unternommen. Die Einteilung der verschiedenen Tiergruppen, die eingesetzten Impfstoffe sowie die Termine für die Immunisierungen und Blutentnahmen sind in **Tabelle 9** und **Tabelle 10** aufgelistet.

3.8 Datenhaltung und Auswertung

3.8.1 Bilddokumentation

Für die Dokumentation der Elektropherogramme und Western- bzw. Immunoblots wurde das Gel-Dokumentationssystem Modell Easy Image Plus, Rev. 4.16 (Fa. Herolab GmbH, Wiesloch) verwendet.

3.8.2 Auswertung von DNS-Sequenzdaten

Zur Ermittlung der DNS-Sequenzen wurde das Programm LASERGENE 2000® (Firma DNASTAR Inc., Madison, USA) verwendet.

3.8.3 Statistische Auswertung

Die Haltung sowie die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand der Programme WinBiAS für Windows (Version 7.02, Ackerman, 1999) und SPSS for Windows (SPSS Inc, Illinois, USA, Version 10.0). Die graphischen Abbildungen wurden mit dem Programmpaket Microsoft® Office 97 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt.

Zur Beschreibung quantitativer Merkmale wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima, Median, Extremwerte und Stichprobenumfänge berechnet. Die Messwerte in dem rHis-StxB2e-ELISA für Schweineserumproben waren rechtsschief verteilt. Deswegen wurden die statistischen Auswertungen mit logarithmisch transformierten Titerwerten (\log_{10}) berechnet. Für die Auswertung betriebspezifischer Parameter wurde der innerbetriebliche StxB2e-Titer als arithmetischer Mittelwert der \log_{10} -Serum-IgG-StxB2e-Titer von alle Tieren eines Betriebs bestimmt.

Einflüsse qualitativer Faktoren auf näherungsweise normalverteilte Merkmale wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) geprüft, bei zwei Gruppen wurde der Student t-Test angewendet. Für die Überprüfung auf Korrelationen bei quantitativen Merkmalen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) verwendet, lag dagegen keine zweidimensional Normalverteilung vor, wurde stattdessen der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) berechnet. Für die Untersuchung des potentiellen Einflusses von mehreren Betriebsparametern auf den StxB2e-Titer wurde unter Ausschluss von Wechselwirkungen eine multiple, schrittweise Kovarianzanalyse (ANCOVA) durchgeführt.

Tabelle 9 Aufbau und Zeitplan der durchgeführten Immunisierungsversuche an Kaninchen

Versuchs Nr.	Tiergruppe	N	Impfantigen	Adjuvans	Applikation	Antigendosis [µg / Tier]	Impfung (Lebenstag)	Blutentnahme (Lebenstag)
1	-	1	rHis-StxB2e	iFA	subkutan	Priming 100 µg Booster 50 µg	0. 14., 28., 42., 56., 70., 84.	0., 14., 28., 42., 56., 70., 84., 98.
2	1	2	Placebo	iFA	subkutan	0 µg	0., 21., 49.	0., 21., 49., 77.
	2	2	BZL	ISA 266	subkutan	318,3 µg	0., 21., 49.	0., 21., 49., 77.
	3	2	BZL	IMS 1313	subkutan	318,3 µg	0., 21., 49.	0., 21., 49., 77.
	4	2	BZL	iFA	subkutan	318,3 µg	0., 21., 49.	0., 21., 49., 77.
	5	2	BZL	HL-3	subkutan	318,3 µg	0., 21., 49.	0., 21., 49., 77.

Erläuterung: **rHis-StxB2e** = säulenchromatografisch aufgereinigtes rHis-StxB2e; **iFA** = inkomplettes Freundisches Adjuvans;
Placebo = physiologische Kochsalzlösung; **BZL** = Bakterienzellysat des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24).

Tabelle 10 Aufbau und Zeitplan der durchgeführten Immunisierungsversuche an Ferkeln

Versuchs Nr.	Tiergruppe	N	Impfantigen	Adjuvans	Applikation	Antigendosis [µg / Tier]	Impfung (Lebenstag)	Blutentnahme (Lebenstag)
3	1	4	rHis-StxB2e	HL-3	intramuskulär	103 µg	0., 28.	0., 28., 42., 56.
	2	5	rHis-StxB2e	ISA 266	intramuskulär	103 µg	0., 28.	0., 28., 42., 56.
	3	4	BZL	HL-3	intramuskulär	329 µg	0., 28.	0., 28., 42., 56.
	4	3	BZL	ISA 266	intramuskulär	329 µg	0., 28.	0., 28., 42., 56.
	5	2	rHis-StxB2e	iFA	intramuskulär	103 µg	0., 28.	0., 28., 42., 56.
	6	4	Placebo	iFA	intramuskulär	0 µg	0., 28.	0., 28., 42., 56.
	7	2	rHis-StxB2e rHis-StxB2e	ISA 266 iFA	intramuskulär	103 µg 103 µg	0. 28.	0., 28., 42., 56.
	8	6	BZL rHis-StxB2e	ISA 266 iFA	intramuskulär	329 µg 103 µg	0. 28.	0., 28., 42., 56.

Erläuterung: **rHis-StxB2e** = säulenchromatografisch aufgereinigtes rHis-StxB2e; **BZL** = Bakterienzellysate des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24); **iFA** = inkomplettes Freundsches Adjuvans; **Placebo** = physiologische Kochsalzlösung.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung von porcinen *Escherichia coli*-Feldisolaten

Im Hinblick auf die Eignung der rekombinanten B-Untereinheit von Stx2e als Fangantigen für die serologische Diagnostik sollten Shigatoxin-bildende *E. coli*-Feldisolat von Schweinen aus Deutschland auf Virulenzfaktoren, welche für Ödemkrankheitserreger typisch sind, geprüft werden. Mit einem PCR-Vorauswahl-Verfahren wurden von 1.428 *E. coli*-Isolaten von 975 Schweinen aus 323 Betrieben, insgesamt 164 Isolate (11,5 %) von 152 Schweinen (15,6 %) aus 53 Betrieben (16,4 %) identifiziert, die ein Shigatoxin der Gruppe 2 kodierten (STEC-2). Von den 164 STEC-2-Isolaten waren 89 zwischen 2000 und 2002 in der bakteriologischen Diagnostik des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere isoliert worden. 75 *E. coli*-Isolate waren im Zeitraum von 1997 bis 1998 im Rahmen der Bestandsbetreuung durch den Schweinegesundheitsdienst der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen isoliert worden.

Mittels PCR wurden alle 164 STEC-2-Isolate auf das Vorkommen von Genen für Toxine (Shigatoxin Typ 2e und *E. coli*-Enterotoxine LT-I, ST-Ip und ST-II) und Fimbrien (F4-, F5-, F6-, F18- und F41), sowie das *eae*-Gen für den Adhäsionsfaktor Intimin untersucht. Durch Objektträgerschnellagglutination sollte mit neun ausgewählten Testseren der O-Typ der *E. coli*-Isolate bestimmt werden. Und schließlich erfolgte durch Anzucht auf Schafblutagar die Überprüfung der Isolate auf Hämolyse.

Mit der *stxB2e*-spezifischen-PCR konnte bei allen 164 Isolaten das Gen für den Shigatoxin-Subtyp Stx2e identifiziert werden. Insgesamt besaßen 89 (54,3 %) der Isolate *E. coli*-Enterotoxingene. Am häufigsten wurde das hitzestabile *E. coli*-Enterotoxin ST-II (52,4 %) nachgewiesen, gefolgt von dem hitzelabilen *E. coli*-Enterotoxin LT-I (40,9 %) und dem hitzestabilen *E. coli*-Enterotoxin ST-Ip (18,3 %). 2,4 % der Isolate besaßen nur ein *E. coli*-Enterotoxingen, dagegen hatten 46,3 % zwei und 5,5 % sogar drei *E. coli*-Enterotoxingene. Bei 146 Isolaten (89,0 %) konnte das *fedA*-Gen, das für die Hauptstrukturuntereinheit der F18-Fimbrien kodiert, nachgewiesen werden. Kein Isolat besaß eines der anderen untersuchten Fimbriengene oder das *eae*-Gen.

Mit den neun Testseren konnte bei 139 Isolaten (84,8 %) der O-Typ bestimmt werden (**Tabelle 11**). 25 Isolate (15,2 %) waren nicht typisierbar, da sie mit keinem oder zwei und mehr der verwendeten Testseren reagierten. Am häufigsten traten die O-Antigene O141 (51,2 %), O139 (19,5 %) und O138 (7,9 %) auf. Isolate mit den O-Antigenen O147 (4,3 %), O149 (1,2 %) und O157 (0,6 %) wurden seltener identifiziert. Hämolyse zeigten insgesamt 153 Isolate (93,3 %).

Anhand der nachgewiesenen Eigenschaften konnten 124 Isolate (75,6 %) als typische Ödemkrankheitserreger identifiziert werden; diese EDEC-Isolate besaßen Gene für Stx2e sowie für F18-Fimbrien. Außerdem konnten diese Isolate den O-Gruppen O138 (8,1 %), O139 (25,0 %) oder O141 (66,9 %) zugeordnet werden. Zusätzlich wiesen alle Isolate einen hämolytischen Phänotyp auf, mit Ausnahme eines einzigen anhämolysierenden Isolates

(**Tabelle 11**). Über die Hälfte der EDEC-Isolate (68,5 %) besaßen zusätzlich Gene für *E. coli*-Enterotoxine des Typs LT-I, ST-Ip und/oder ST-II.

Tabelle 11 **Charakterisierung von 164 stx2e-positiven *E. coli*-Isolaten von Schweinen.**
(Ergebnisse der Bosworth- bzw. stxB2e-B-PCR, Serotypisierung und Hämolyse-Nachweis)

Virulenzfaktoren	Anzahl Stämme										anderer O-Typ ¹⁾
	getestet	eae	O138	O139	O141	O147	O149	O157			
Stx2e, F18, Hly, ST-Ip, ST-II, LT	9	0	0	0	2	7	0	0	0	0	
Stx2e, F18, Hly, ST-Ip, ST-II	17	0	5	0	3	0	0	0	1	8	
Stx2e, F18, Hly, ST-II, LT	58	0	0	0	57	0	0	0	0	1	
Stx2e, F18, Hly, ST-Ip	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Stx2e, F18, Hly	60	0	5	30	20	0	0	0	0	5	
Stx2e, F18	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Stx2e, ST-Ip, ST-II	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Stx2e, ST-Ip	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
Stx2e, ST-II	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Stx2e, Hly	8	0	3	1	0	0	0	0	0	4	
Stx2e	6	0	0	0	1	0	2	0	0	3	
Insgesamt	164	0	13	32	84	7	2	1		25	

Erläuterung: **F18** = F18-Fimbrien; **Hly** = Hämolyse; **LT** = hitzelabiles *E. coli*-Enterotoxin LT-I; **ST-Ip** = hitzestabiles *E. coli*-Enterotoxin ST-Ip; **ST-II** = hitzestabiles *E. coli*-Enterotoxin ST-II, **Stx2e** = Shigatoxin vom Typ 2e,
¹⁾ Isolate reagierten mit keinem oder mit zwei und mehr der verwendeten Testseren.

4.2 Etablierung und Evaluierung des rHis-StxB2e-ELISA

4.2.1 Identitätsprüfung des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24)

Um von Beginn an sicherzustellen, dass mit dem richtigen Antigenmaterial gearbeitet wurde, wurde der gentechnisch veränderte *E. coli*-Stamm BL21(DE3, pHIT-IV-24) aus der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere unter selektiven Bedingungen angezüchtet. Die Identität des Stammes wurde schrittweise durch Erstellung des Plasmidprofiles, PCR-Analyse und DNS-Sequenzierung überprüft.

Bei der Analyse des Plasmidprofils des Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) wurde ein Plasmid mit einer molekularen Masse von 8,6 MDa nachgewiesen, das somit mit der zuvor errechneten Größe von 8,8 MDa weitgehend übereinstimmte. Mittels PCR mit den die Klonierungszone umgreifenden Primern pET-A und pET-B konnte zudem ein spezifisches Amplifikat von ca. 440 bp erzeugt werden, das ebenfalls mit der errechneten Größe von 438 bp gut übereinstimmte. Zur endgültigen Abklärung der Identität des BL21(DE3, pHIT-IV-24)-Stammes wurde die Nukleotidsequenz des gentechnisch eingefügten *stxB2e*-Fragments analysiert. Hierbei zeigte sich, dass das *stxB2e*-Gen ohne die eigene Signalpeptidsequenz passgenau in den Expressions-Leserahmen des pET15b-Vektors ligiert worden war. Durch die Ligation über die Restriktionsschnittstelle *Nde*I war am 5'-Ende des *stxB2e*-Gens eine 57 bp lange, einen Histidin-Marker kodierende Nukleotidsequenz eingefügt worden. Am 3'-Ende waren durch die Restriktion mit *Bam*HI das eigentliche Stopcodon zerstört und an dessen Stelle 9 zusätzliche Nukleotide eingefügt worden. Die Nukleotidsequenz von *stxB2e* stimmte vollständig mit der bereits veröffentlichten *stxB2e*-Nukleotidsequenz des *E. coli*-Stammes S1191 überein (**Abbildung 1**; **Weinstein et al., 1988**, Genbank, Datenbank-Eintrag M21534).

pHIT-IV-24	ATG GGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGC
M21534	-----
rHis-StxB2e	<i>M G S S H H H H H S S G L V P R</i>
	<i>NdeI</i>
pHIT-IV-24	GGCAGCCATatggcggattgtgctaaaggtaaaattgagttttccaagtat
M21534	-----atggcggattgtgctaaaggtaaaattgagttttccaagtat
rHis-StxB2e	<i>G S H M A D C A K G K I E F S K Y</i>
pHIT-IV-24	aatgaggataataccttttactgtgaagggtgtcaggaagagaataactggacg
M21534	aatgaggataataccttttactgtgaagggtgtcaggaagagaataactggacg
rHis-StxB2e	<i>N E D N T F T V K V S G R E Y W T</i>
pHIT-IV-24	aacagatggaatttgcagccattgttacaaagtgtcagctgacagggatg
M21534	aacagatggaatttgcagccattgttacaaagtgtcagctgacagggatg
rHis-StxB2e	<i>N R W N L Q P L L Q S A Q L T G M</i>
pHIT-IV-24	actgtaacaatcatatctaatacctgcagttcagggtcaggctttgcccag
M21534	actgtaacaatcatatctaatacctgcagttcagggtcaggctttgcccag
rHis-StxB2e	<i>T V T I I S N T C S S G S G F A Q</i>
	<i>BamHI</i>
pHIT-IV-24	gtgaagttttaacGGATCCGGCTGCT TAA
M21534	gtgaagttttaactga-----
rHis-StxB2e	<i>V K F N G S G C .</i>

Abbildung 1 Nukleotidsequenzvergleich des rekombinanten *stxB*e-Gens im *E. coli*-Transformanten BL21(DE3, pHIT-IV-24) mit dem *stxB*2e-Gen von *E. coli* S1191 sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Fusionsproteins rHis-StxB2e.

Vergleich des Inserts von BL21(DE3, pHIT-IV-24) mit der Sequenz der *stxB*2e-Untereinheit von Position 1.271 bis 1.474 bp (Genbank Eintrag M21534).

Großbuchstaben: Anteile des pET15b-Vektors;

Fettdruck: Start- und Stopcodon;

Unterstrichungen: Restriktionsschnittstellen;

Kleinbuchstaben: inserierte *stxB*2e-Nukleotidsequenz;

Großbuchstaben in Kursiv: Aminosäuresequenz des rHis-StxB2e-Proteins im Einbuchstaben-Code

4.2.2 Reinheitsprüfung des rHis-StxB2e-Antigens

Um die Expression des StxB2e-Fusionsproteins zu überprüfen, wurde der Stamm BL21(DE3, pHIT-IV-24) unter Carbenicillin-Selektionsdruck angezüchtet, mit IPTG induziert und die Zellen lysiert. Das Proteinprofil wurde mittels Tricine-PAGE und Westernblot analysiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des induzierten Lysates war eine dominierende Bande von ca. 8,4 kDa sichtbar, welche mit der errechneten molekularen Masse von 10,2 kDa des rHis-StxB2e einigermaßen übereinstimmte (**Abbildung 2**). Ohne die Zugabe von IPTG war dagegen eine solche dominante Bande im Zelllysate nicht sichtbar. Die erfolgreiche Fusion mit dem Histidin-Tag wurde durch die Detektion mit dem Konjugat Ni²⁺-NTA-POD, die Expression der StxB2e-spezifischen Anteile mit dem StxB2e-spezifischen monoklonalen Antikörper 5G10 im Westernblot bestätigt (**Abbildung 3**).

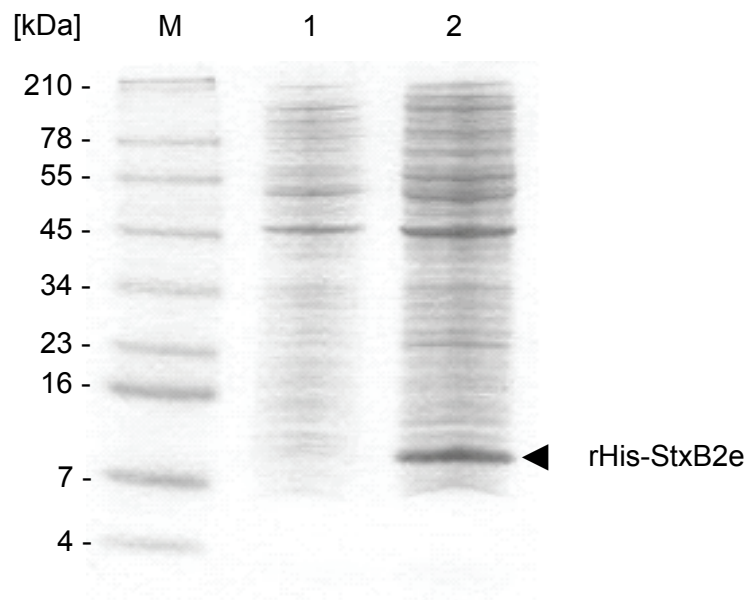


Abbildung 2 Proteinprofil des *E. coli* BL21(DE3, pHIT-IV-24)-Stammes mit und ohne IPTG-Induktion.

(10 % iges Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gel, Coomassie-Brillant-Blau-Färbung, Probenauftrag entspricht 200 µl der Bakterienkultur).

Spur 1: Bakterienzelllysate vor Induktion;

Spur 2: Bakterienzelllysate 5 h nach Induktion mit IPTG;

M = Molekularmassenstandard SeeBlue™ Pre-Stained Standards;

►: rHis-StxB2e.

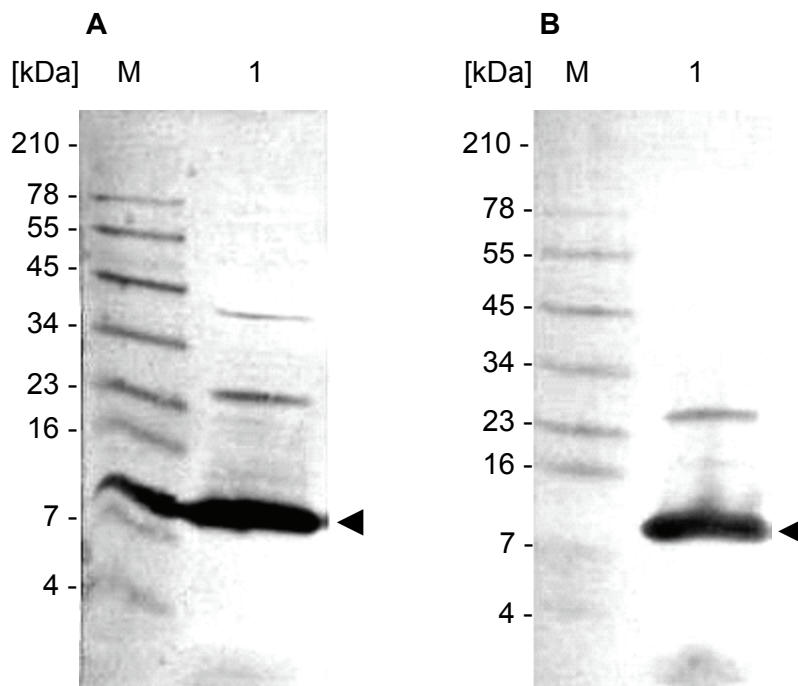


Abbildung 3 Nachweis von rHis-StxB2e mit Ni^{2+} -NTA-POD bzw. dem monoklonalen Antikörper 5G10 mittels Westernblot.

(Westernblot von Proteinprofilen des induzierten BL21(DE3, pHIT-IV-24)-Stammes nach Auftrennung in 10 %-igem Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gel).

- A:** Detektion mit Ni^{2+} -NTA-POD;
- B:** Detektion mit dem monoklonalen Antikörper 5G10;
- 1:** Bakterienzellysate des BL21(DE3, pHIT-IV-24) nach 5 h Induktion (Probenauftrag entspricht 200 μl der Bakterienkultur);
- M:** Molekularmassenstandard SeeBlue™ Pre-Stained Standards;
- rHis-StxB2e.

Um rHis-StxB2e als Fangantigen für den rHis-StxB2e-ELISA sowie zur Immunisierung von Kaninchen und Schweinen in möglichst reiner Form zu verwenden, wurde das Fusionsprotein anhand des genetisch eingeführten Histidin-Markers affinitätschromatographisch an einer Ni^{2+} -NTA-Matrix aufgereinigt. Nach Analyse der einzelnen Fraktionen der Aufreinigung zeigte sich, dass rHis-StxB2e mit dem gewählten Verfahren hochgradig rein aus dem Bakterienzellysate gewonnen werden konnte (**Abbildung 4**). Die Ausbeute lag bei durchschnittlich 4 mg rHis-StxB2e je Liter Bouillonkultur (von 1,8 mg bis 5,5 mg).

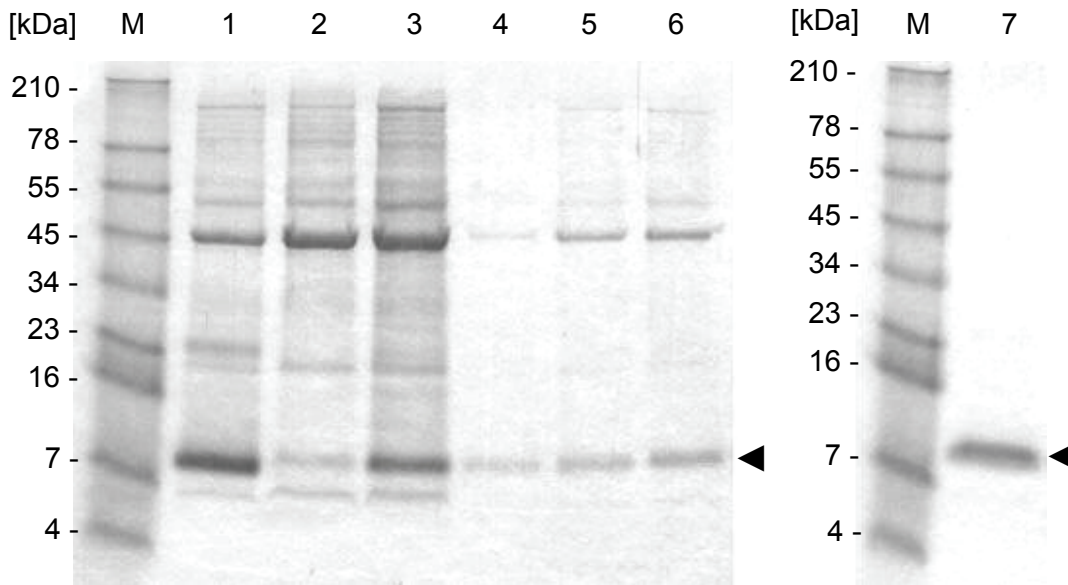


Abbildung 4 Exemplarische Darstellung der Aufreinigung von rHis-StxB2e an einer Ni^{2+} -NTA-Matrix, sowie des im ELISA verwendeten Fangantigens.

(10 %-iges Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gel, Coomassie-Brillant-Blau-Färbung, Probenaufrag jeweils 10 μl der entsprechenden Fraktion).

Spur 1: *E. coli* BL21(DE3, pHIT-IV-24) 5 h nach Induktion mit IPTG und Zellaufschluß mittels French-Presse;

Spuren 2 und 3: Probendurchläufe während der Beladung der Ni^{2+} -NTA-Matrix;

Spuren 4, 5 und 6: verschiedene Waschfraktionen (pH 7,0);

Spur 7: Eluatfraktion (pH 3,0);
entspricht dem im ELISA eingesetzten Fangantigen;

M: Molekularmassenstandard SeeBlue™ Pre-Stained Standards;

►: rHis-StxB2e.

4.2.3 Intra- und Interassaypräzision

Für den rHis-StxB2e-ELISA wurde das im **Kapitel 3.6.2** aufgeführte Standardprotokoll entworfen. Um Aussagen über die Qualität des ELISA-Standardprotokolls treffen zu können, wurden die Intra- und Interassaypräzision des ELISAs bestimmt. Zudem standen polyklonale Schweinehyperimmunseren zur Verfügung, die Stx2e neutralisierende Aktivität im Stx2e-Neutralisationstest aufwiesen, mit denen die Sensitivität des rHis-StxB2e-ELISAs überprüft wurde. Letztendlich wurden Grenzwerte für eine diagnostische Beurteilung der Serumproben festgelegt.

Um die Varianz der Ergebnisse im rHis-StxB2e-ELISA innerhalb eines einzigen Testansatzes zu überprüfen, wurde die Intraassaypräzision bestimmt. In Vorversuchen waren hierfür drei hoch-, zwei mittel- und fünf niedrigtitrige Serumproben ausgewählt worden. Diese Seren wurden jeweils zehnmal im Dreifachansatz auf einer Mikrotiterplatte getestet. In der **Tabelle 12** sind die hierbei erhaltenen arithmetischen Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten aufgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der ELISA-Ergebnisse zu gewährleisten, sollte der Variationskoeffizient unter 20 % liegen (**Spencer and Nicoloff,**

1990). Dies war bei neun der zehn getesteten Serumproben auch der Fall, die niedrigtitrige Serumprobe II 41 lag mit einem Variationskoeffizient von 22,0 % knapp über dieser Grenze.

Um die Varianz der rHis-StxB2e-ELISA-Ergebnisse zwischen verschiedenen Testzeitpunkten zu überprüfen (Interassaypräzision), wurden die bereits zur Bestimmung der Intraassaypräzision verwendeten Serumproben jeweils im Dreifachansatz an 10 verschiedenen Tagen bearbeitet. Wie in der **Tabelle 13** dargestellt, lag der Variationskoeffizient bei 5 der getesteten Serumproben unter 20 %. Bei den übrigen fünf Serumproben lag der Variationskoeffizient allerdings über 20 %. Hierbei handelte es sich einerseits um vier besonders niedrigtitrige Serumproben, deren Variationskoeffizienten mit 23,3 bis 70,9 % die o.g. Grenze überschritten. Außerdem lag die stärker (1:800) verdünnte Serumprobe "R-1384/00" mit einem Variationskoeffizienten von 57,5 % über dem 20 %-Grenzwert. Da hohe Vorverdünnungen der Seren zu hohen Variationskoeffizienten führten, wurden die Schweineserumproben in den weiteren Tests ausschließlich in einer Verdünnung von 1:100 getestet.

Tabelle 12 Ergebnisse zur Bestimmung der Intraassaypräzision des rHis-StxB2e-ELISA.
(10-malige Testwiederholung in einer Mikrotiterplatte)

Titer im Vorversuch [Std. %]	Serumprobe	Titer [Std. %]		Variationskoeffizient [%]
		Mittelwert	Standardabweichung	
> 44	IV 32	111,1	3,6	3,3
> 44	Pool ¹⁾	99,3	3,8	3,8
> 44	IV 21	97,1	3,1	3,2
26 - 44	R-1376/00	27,7	3,8	13,5
< 17	R-1383/00	13,2	1,5	11,7
< 17	III 136	9,8	1,2	12,5
< 17	R-1384/00 ²⁾	8,5	1,3	15,7
< 17	R-1382/00	8,0	0,7	8,8
< 17	II 42	4,3	0,7	16,6
< 17	II 41	3,2	0,7	22,0

Erläuterung: ¹⁾ Gemisch aus den Schweineserumproben IV 56 und IV 142 (Verhältnis 1:1);
²⁾ R-1384/00 Serumverdünnung in Verhältnis 1:800.

Tabelle 13 Ergebnisse zur Bestimmung der Interassaypräzision des rHis-StxB2e-ELISA.

(10-malige Testwiederholung an 10 verschiedenen Tagen)

Titer im Vorversuch [Std. %]	Serumprobe	Titer [Std. %]		Variationskoeffizient [%]
		Mittelwert	Standardabweichung	
> 44	IV 32	115,6	8,6	7,4
> 44	Pool ¹⁾	100,0	1,9	1,9
> 44	IV 21	107,1	5,2	4,8
26 - 44	R-1376/00	26,4	3,8	14,4
< 17	R-1383/00	12,7	1,2	9,6
< 17	III 136	12,4	2,9	23,3
< 17	R-1384/00 ²⁾	15,7	9,0	57,5
< 17	R-1382/00	9,6	2,2	22,5
< 17	II 42	7,5	2,6	34,5
< 17	II 41	2,8	2,0	70,9

Erläuterung: ¹⁾ Gemisch aus den Schweineserumproben IV 56 und IV 142 (Verhältnis 1:1);²⁾ R-1384/00 Serumverdünnung in Verhältnis 1:800.

4.2.4 Berechnung von Grenzwerten (Cut-Off)

Um die Ergebnisse der ELISA-Untersuchung der Serumproben einteilen zu können, wurden Grenzwerte festgelegt. Hierzu wurden 136 Serumproben von 3,5 bis 5,5 Wochen alten Ferkeln eine Woche vor dem Absetztermin eingesetzt. Anhand der Daten aus früheren Untersuchungen wurde erwartet, dass diese Tiere im rHis-StxB2e-ELISA negativ reagieren würden (**Lege, 2003**). Von den 136 Serumproben stammten 106 Proben aus vier unterschiedlichen hessischen Betrieben, in denen in den letzten drei Jahren bzw. aktuell vor der Probenentnahme die Ödemkrankheit aufgetreten war (82 Serumproben aus 3 Betrieben) oder nicht beobachtet worden war (24 Serumproben aus 1 Betrieb). Außerdem wurden 30 Serumproben aus einem polnischen Betrieb, in dem Ödemkrankheit anhand klinischer und bakteriologischer Befunde ausgeschlossen worden war, in die Untersuchung einbezogen.

Im Mittel wurden nur sehr niedrige Titer (von 0,65 bis 12,06 Std. %) bei den Ferkeln nachgewiesen, und zwar unabhängig von dem jeweiligen Vorbericht aus dem Betrieb in Bezug auf Ödemkrankheitsfälle der letzten drei Jahre. Der aus allen Einzelwerten der 136 getesteten Ferkelproben gebildete Mittelwert "MW_{Kontrollseren}" betrug 8,27 Std. %, die Standardabweichung "Stabwn_{Kontrollseren}" 8,78 Std. %. Diese beiden Werte wurden dann zur Berechnung von Grenzwerten für die serologische Eingruppierung der Proben verwendet (**Tabelle 14**).

Tabelle 14 Grenzwerte für die serologische Einteilung im rHis-StxB2e-ELISA.

Grenzen	Anti-Stx2e Serum-IgG-Titer [Std. %]	serologischer Befund
$MW_{\text{Kontrollseren}} + 1 \times \text{Stabwn}_{\text{Kontrollseren}}$	$\leq 17,00$	negativ
$MW_{\text{Kontrollseren}} + 2 \times \text{Stabwn}_{\text{Kontrollseren}}$	17,01 - 26,00	fraglich
$MW_{\text{Kontrollseren}} + 4 \times \text{Stabwn}_{\text{Kontrollseren}}$	26,01 - 44,00	mittelgradig positiv
$MW_{\text{Kontrollseren}} + 4 \times \text{Stabwn}_{\text{Kontrollseren}}$	$\geq 44,01$	hochgradig positiv

Erläuterung: $MW_{\text{Kontrollseren}}$: arithmetischer Mittelwert der 136 Kontrollseren;
 $\text{Stabwn}_{\text{Kontrollseren}}$: Standardabweichung der 136 Kontrollseren.

4.2.5 Prüfung des rHis-StxB2e-ELISA an Serumproben von geimpften Schweinen

Anhand von sieben Stx2e-neutralisierenden Schweinehyperimmunserumproben sollte die Bindung von Stx2e-spezifischen Antikörpern an das Fangantigen rHis-StxB2e überprüft werden. Die Serumproben stammten von Schweinen, die wiederholt mit Formaldehyd-inaktivierten Kulturüberständen von Stx2e-produzierenden *E. coli* immunisiert worden waren (Alexa et al., 1998).

Wie in der **Abbildung 5** zu sehen ist, besaßen alle diese Serumproben hohe Titer von 52,81 bis 178,92 Std. % und waren demnach als hoch positiv einzustufen.

4.3 Antigenität und Immunogenität von rHis-StxB2e

Im Hinblick auf die Verwendung von rHis-StxB2e als Vakzin wurde die Fähigkeit des Fusionsproteins, Stx2e-spezifische polyklonale IgG-Antikörper zu induzieren, in drei Immunisierungsversuchen an Kaninchen und Schweinen geprüft. In den verschiedenen Versuchen wurden insbesondere die Parameter Antigenkonzentration, Aufreinigungsgrad des rekombinanten StxB2e sowie Art und Konzentration des Adjuvans variiert.

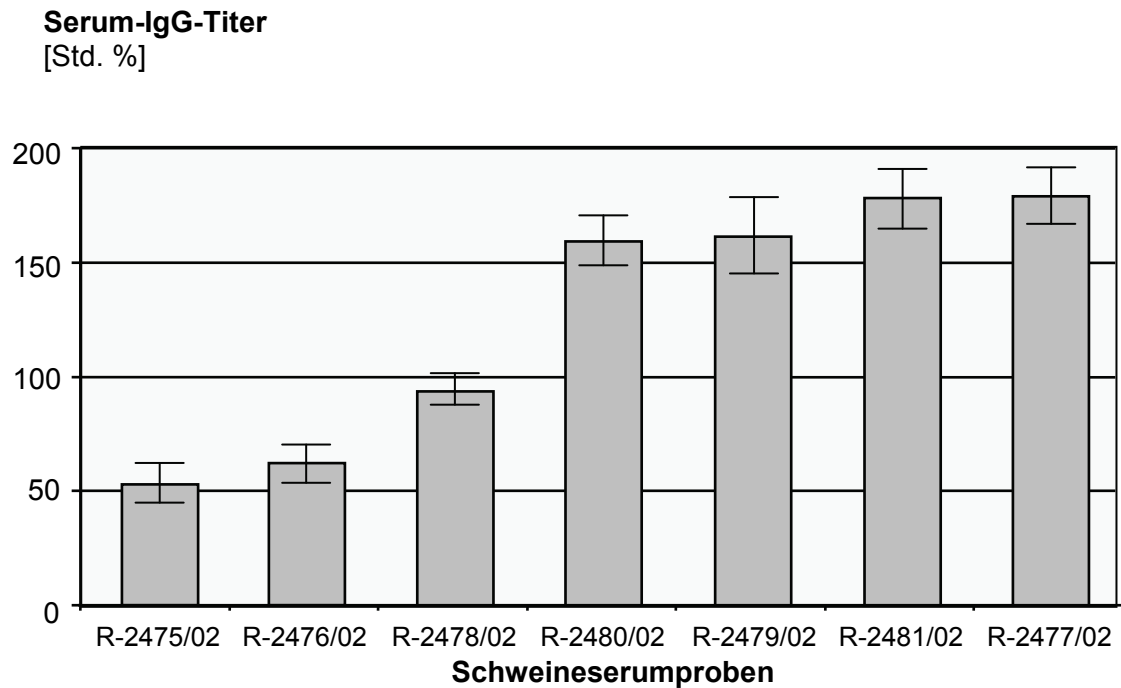


Abbildung 5 Nachweis von Anti-StxB2e-IgG im Serum von mit Stx2e immunisierten Schweinen mittels ELISA.

Serum-IgG-Titer [Std. %] im rHis-StxB2e-ELISA;
Serumverdünnung 1:100; Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Messungen.

4.3.1 Herstellung eines Hyperimmunserums gegen rHis-StxB2e im Kaninchen (Immunisierungsversuch Nr. 1)

Das affinitätschromatographisch aufgereinigte rHis-StxB2e-Impfantigen wurde mit inkomplettem Freundschens Adjuvans versetzt und mehrmals an ein Kaninchen subkutan verimpft. Unmittelbar vor der ersten und jeweils 14 Tage nach den Impfungen wurden dem Kaninchen Blutproben entnommen. Die Serumproben wurden im rHis-StxB2e-ELISA auf spezifische Antikörper untersucht. Mit dem Stx2e-Neutralisationstest wurde außerdem überprüft, ob in der Serumprobe nach der 7. Immunisierung Stx2e-neutralisierende Antikörper vorhanden waren.

Bereits nach der 2. Immunisierung konnte ein Anstieg des StxB2e-Serum-Ig-Titers nachgewiesen werden (**Abbildung 6**). In jeder anschließend entnommenen Serumprobe wurde stets ein höherer Titer als in den vorherigen Proben ermittelt. Das in diesem Immunisierungsversuch erzeugte rHis-StxB2e-Kaninchen-Hyperimmunserum wurde im Stx2e-Neutralisationstest zudem untersucht, ob die durch rHis-StxB2e induzierten IgG-Antikörper in der Lage waren, die für Verozellen zytotoxische Wirkung zu neutralisieren. Nach 96-stündigem Co-Inkubation der Verozellen mit Stx2e und dem Serum betrug jedoch der Anteil lebender Verozellen nur 10 %, so dass gefolgert werden musste, dass durch die im ELISA nachgewiesenen StxB2e-spezifischen Immunglobuline keine Stx2e-Neutralisation erfolgte.

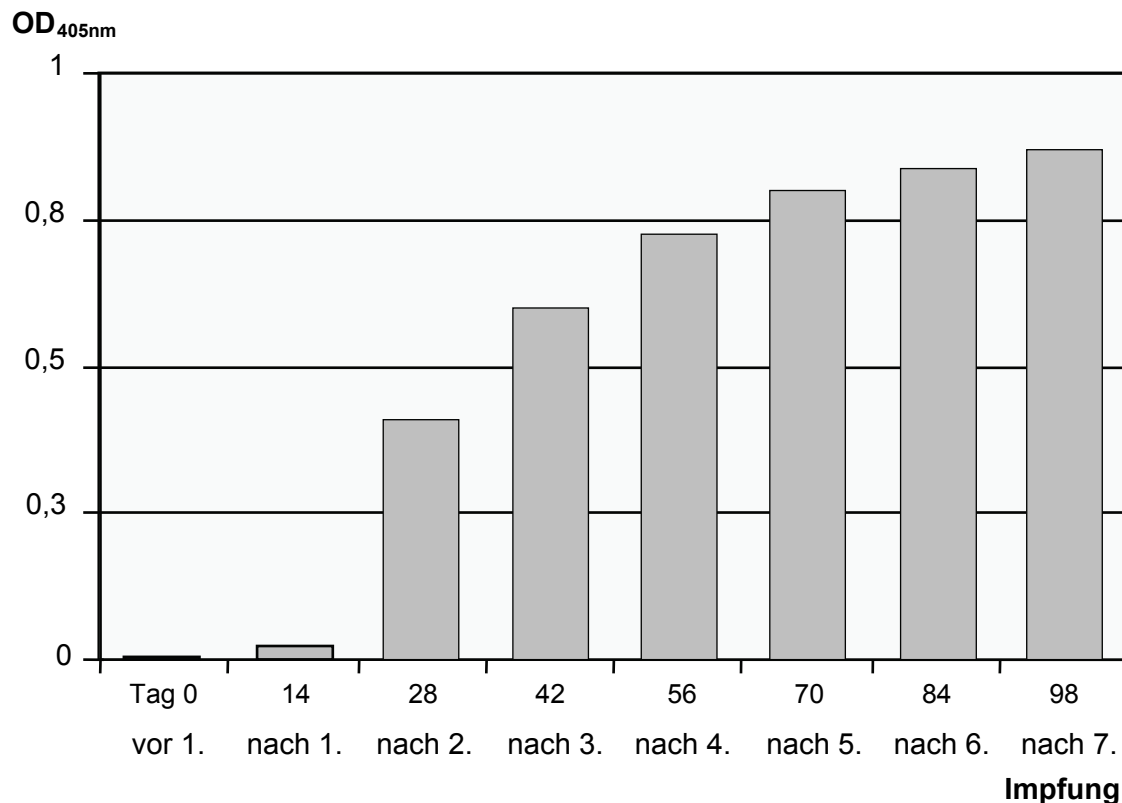


Abbildung 6 Humorale Immunantwort beim Kaninchen auf Impfung und Boostern mit rHis-StxB2e-Vakzin.

Serum-Ig-Titer im rHis-StxB2e-ELISA, Immunisierungsversuch Nr. 1;
Arithmetischer Mittelwert aus jeweils 2 Testansätzen;
Serumverdünnung 1:800

4.3.2 Immunogenität von rHis-StxB2e bei Kaninchen (Immunisierungsversuch Nr. 2)

Um den Einfluss verschiedener Adjuvantien auf die Bildung Stx2e-spezifischer Antikörper zu testen, wurden insgesamt acht Kaninchen mit dem selben Impfantigen aber verschiedenen Adjuvansformulierungen behandelt. Als Impfantigen diente ein Bakterienzellysate des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24). Als Adjuvantien wurden verwendet: ISA 266, IMS 1313, inkomplettes Freundsches Adjuvans und HL-3. Zwei weitere Kaninchen dienten als Kontrollgruppe. Diesen Tieren wurde an den Impfterminen jeweils physiologische Kochsalzlösung vermischt mit inkomplettem Freundsches Adjuvans appliziert. Unmittelbar vor und 21 Tage nach der 1. Immunisierung, sowie jeweils 28 Tage nach der 2. und 3. Immunisierung wurden den Kaninchen Blutproben entnommen bzw. die Seren gewonnen. Deren Untersuchung auf Stx2e-spezifische Antikörper erfolgte mittels rHis-StxB2e-ELISA und Stx2e-Neutralisationstest.

Die mit Bakterienzellysate und inkomplettem Freundsches Adjuvans immunisierten Kaninchen wiesen nach der 1. und den nachfolgenden Immunisierungen im Mittel stets die höchsten rHis-StxB2e-Titerwerte auf. In der **Abbildung 7** sind die rHis-StxB2e-Titerwerte als eine reine Datenbeschreibung mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Die im

Mittel niedrigsten Titerwerte nach der 1. und 2. Immunisierung wies die Gruppe derjenigen Kaninchen auf, denen das rekombinante Protein mit ISA 266 appliziert worden war, und nach der 3. Immunisierung die Gruppe der Tiere, denen rHis-StxB2e mit IMS 1313 verabreicht worden war. Bei den Kontrolltieren wurde zu keinem Zeitpunkt des Versuches ein Anstieg der spezifischen Antikörpertiter beobachtet. Im explorativen paarweisen Vergleich (Student's t-Test) zeigte sich, dass nach der 3. Immunisierung der mittlere Titer der mit rHis-StxB2e und inkomplettem Freundschens Adjuvans immunisierten Kaninchen signifikant höher war, als der mittlere Titer der mit rHis-StxB2e und ISA 266 ($p = 0,039$) bzw. IMS 1313 ($p = 0,026$) immunisierten Tiere. Auch war der mittlere Titer der Kaninchen, die rHis-StxB2e und HL-3 appliziert bekommen hatten, signifikant höher als der mittlere Titer derjenigen Kaninchen, denen rHis-StxB2e und IMS 1313 appliziert worden war ($p = 0,05$).

Die Überprüfung der Serum-Ig-Antikörper auf ihre Fähigkeit, Stx2e zu neutralisieren, erfolgte im Stx2e-Neutralisationstest (**Abbildung 8**). In diesem Versuch konnte die nach der 3. Immunisierung mit rHis-StxB2e und HL-3 von einem Kaninchen entnommen Serumprobe die zytotoxische Wirkung von Stx2e neutralisieren (88,4 % BC5 BB12). Bei keinem der übrigen Kaninchen wurden Stx2e-neutralisierende Antikörper nachgewiesen.

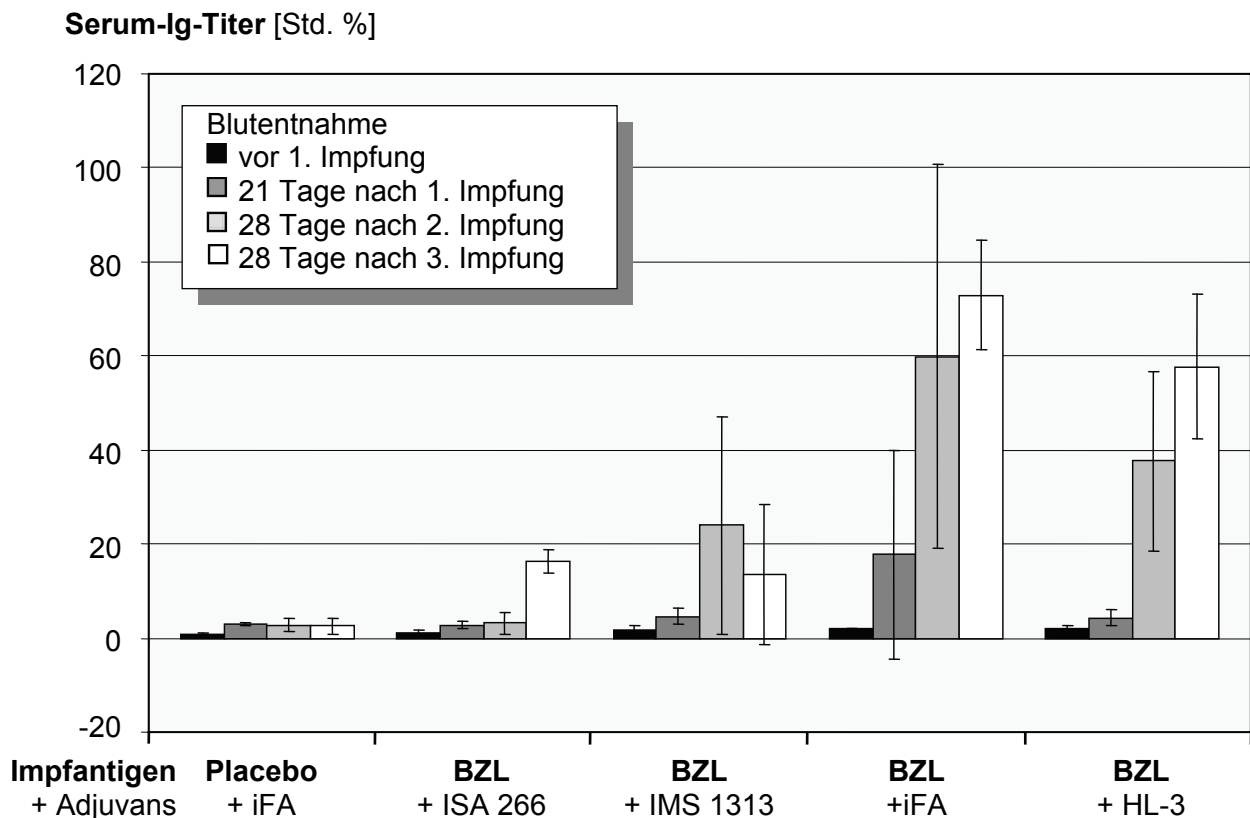


Abbildung 7 Anti-Stx2e-Antikörper bei Kaninchen nach Impfung mit Bakterienzellysat des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) und verschiedenen Adjuvantien.

Serum-Ig-Titer im Kaninchen rHis-StxB2e-ELISA, Immunisierungsversuch Nr. 2. Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung von je zwei Tieren für eine alleinige Datenbeschreibung. Blutentnahme am 0., 21., 49. und 77. Versuchstag. **iFA** = inkomplettes Freundsches Adjuvans, **BZL** = Bakterienzellysat des *E. coli*-Stammes BL21(DE3/pHIT-IV-24); **Placebo** = physiologische Kochsalzlösung.

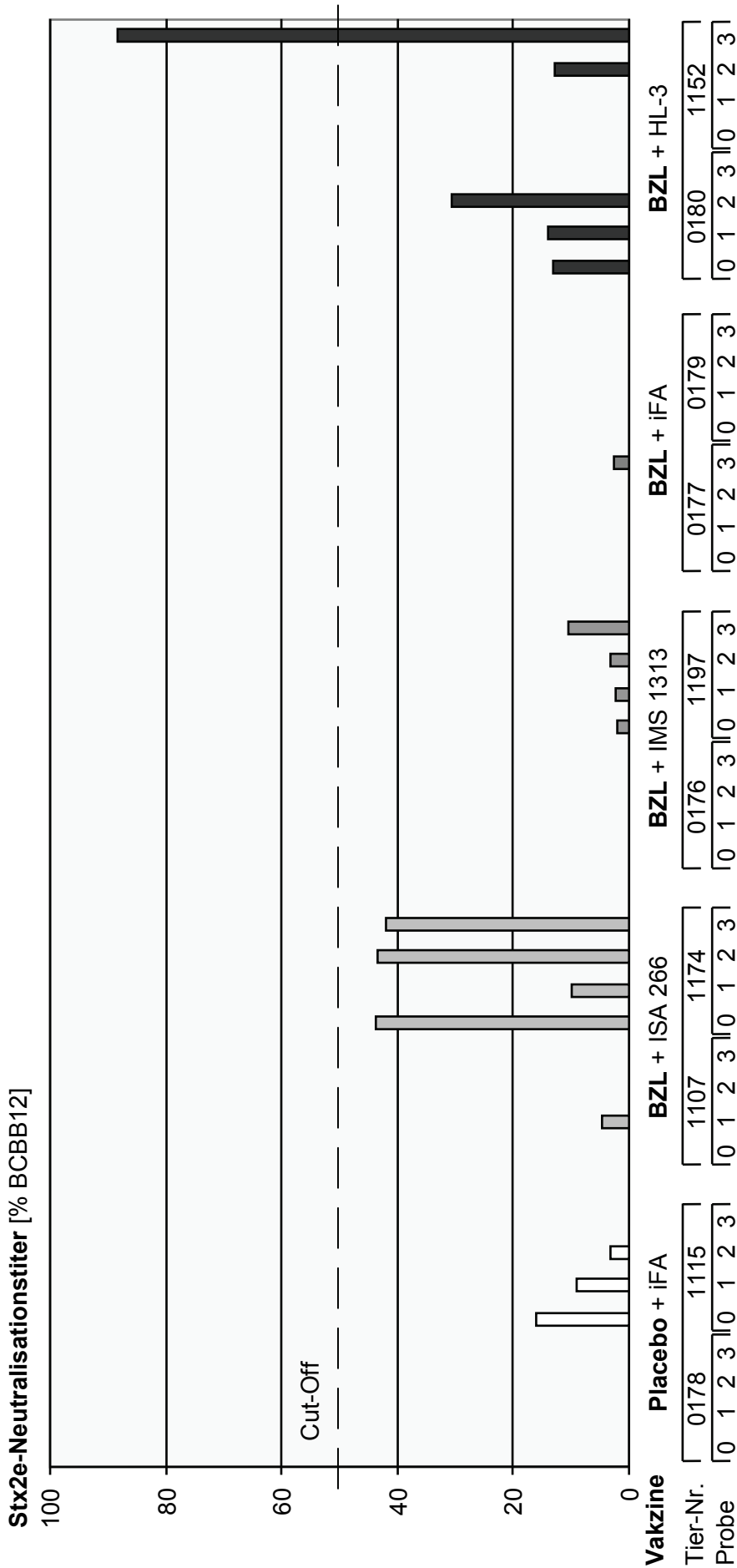


Abbildung 8 Stx2e-neutralisierende Serum-Antikörper bei Kaninchen nach Immunisierung mit rHis-StxB2e und verschiedenen

Adjuvantien (n = 40).

Ergebnisse des Neutralisationstests; **0** = vor der 1. Immunisierung, **1** = 21 Tage nach der 1. Immunisierung, **2** = 28 Tage nach 2. Immunisierung, **3** = 28 Tage nach der 3. Immunisierung,

iFA = inkomplettes Freundsches Adjuvans, **BZL** = Bakterienzellysat des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24); **Place-**

bo = physiologische Kochsalzlösung.

4.3.3 Immunogenität von rHis-StxB2e bei Ferkeln (Immunisierungsversuch Nr. 3)

In diesem Versuch sollte die Bildung StxB2e-spezifischer Antikörper bei Ferkeln nach Immunisierung mit rHis-StxB2e untersucht werden. Als Impfstoff wurde affinitätschromatographisch aufgereinigtes rHis-StxB2e oder Bakterienzellysate des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) vermischt mit inkomplettem Freundschens Adjuvans, ISA 266 oder HL-3 verwendet. Insgesamt 26 Ferkel wurden mit den verschiedenen Impfstoffen zweimal intramuskulär geimpft; vier weitere Ferkel dienten als Kontrollgruppe und bekamen physiologische Kochsalzlösung mit inkomplettem Freundschens Adjuvans appliziert. Direkt vor und 4 Wochen nach der 1. Immunisierung sowie 2 Wochen und 4 Wochen nach der 2. Immunisierung wurden den Tieren Blutproben entnommen und die entsprechenden Seren mittels ELISA auf StxB2e-spezifische Antikörper sowie mittels Stx2e-Neutralisationstest auf Stx2e-neutralisierende Antikörper untersucht.

In der Kontrollgruppe konnten während des gesamten Versuchszeitraumes keine rHis-StxB2e-spezifischen Antikörper detektiert werden. In allen Gruppen, in denen die Ferkel mit rHis-StxB2e geimpft worden waren, war sowohl zwei als auch vier Wochen nach der 2. Impfung im Mittel ein signifikant höherer Titer als in der Kontrollgruppe nachweisbar (**Abbildung 9**). Einzelne Tiere in den Gruppen, in denen die Ferkel mit aufgereinigtem rHis-StxB2e und HL-3 (Gruppe 1), bzw. ISA 266 (Gruppen 2 und 7) oder mit Bakterienzellysate und HL-3 (Gruppe 3) immunisiert worden waren, zeigten eine Serokonversion bereits vier Wochen nach der 1. Impfung. Zwei Wochen nach der 2. Impfung zeigten im Mittel diejenigen Ferkel den höchsten mittleren Titer, denen Bakterienzellysate und ISA 266 (Gruppe 4) appliziert worden waren. Dagegen zeigten den niedrigsten Titer diejenigen Ferkel, welche mit rHis-StxB2e und inkomplettem Freundschens Adjuvans (Gruppe 5) immunisiert worden waren (Gruppen-Mittelwert signifikant niedriger als jeweils die Mittelwerte der Gruppen 1, 2, 4, 7 bzw. 8; explorativer paarweiser Vergleich mit dem Student's t-Test, $p \leq 0,05$). Auch noch vier Wochen nach der 2. Immunisierung wiesen im Mittel von den mit rHis-StxB2e-immunisierten Ferkeln die Tiere der Gruppe 4 den höchsten und die der Gruppe 5 den niedrigsten Titer auf. Der Titer-Mittelwert der Gruppe 5 war zudem signifikant niedriger als die Titer-Mittelwerte der Gruppen 2 (rHis-StxB2e und ISA 266), 4 (Bakterienzellysate und ISA 266) und 8 (Bakterienzellysate und ISA 266 sowie rHis-StxB2e und inkomplettes Freundschens Adjuvans) auf. Der mittlere Titer der Ferkel der Gruppe 8 war zu diesem Zeitpunkt auch noch signifikant höher als der Mittelwert der Titer der Gruppen 1 (rHis-StxB2e und HL-3) und 3 (Bakterienzellysate und HL-3). Bei den mit aufgereinigtem rHis-StxB2e-immunisierten Ferkeln wiesen die Tiere, denen das Antigen mit ISA 266 appliziert worden war, im Mittel einen signifikant höheren Titer auf als die Ferkel, bei denen HL-3 als Adjuvans verwendet worden war.

Um Rückschlüsse auf den Einfluß des verwendeten Adjuvans bzw. des Aufreinigungsgrades von rHis-StxB2e auf die Bildung spezifischer Antikörper ziehen zu können, wurden die Tiergruppen nach Art des verwendeten Impfstoffes gruppiert und die Mittelwertunterschiede mittels Student's t-Test auf Signifikanz geprüft. Bei den mit ISA 266 immunisierten Ferkeln wurden im Mittel signifikant höhere Titer ermittelt als bei Ferkeln, die HL-3 als Adjuvans erhalten hatten ($p < 0,05$) (**Tabelle 15**). Kein signifikanter Unterschied ließ sich allerdings zwischen den Gruppen feststellen, welche aufgereinigtes rHis-StxB2e oder Bakterienzellysat des Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) erhalten hatten ($p > 0,05$).

Tabelle 15 StxB2e-Serum-IgG-Titer bei Ferkeln in Abhängigkeit von den verwendeten Adjuvantien bzw. dem rHis-StxB2e-Aufreinigungsgrad.
rHis-StxB2e-ELISA-Ergebnisse, Immunisierungsversuch Nr. 3

			rHis-StxB2e-IgG-Titer [Std. %, Mittelwert \pm Standardabweichung]		
			Serumproben		
Ferkel-Gruppen		n	4 Wo. nach 1. Impfung	2 Wo. nach 2. Impfung	4 Wo. nach 2. Impfung
Adjuvansvergleich					
HL-3	Gruppen 1 und 3	8	32,3 \pm 31,1	167,2 \pm 21,7	155,2 \pm 29,7
ISA 266	Gruppen 2, 7 und 8	13	11,1 \pm 22,4	180,1 \pm 15,9	182,3 \pm 11,4
Vergleich des rHis-StxB2e-Aufreinigungsgrades					
BZL	Gruppen 3 und 4	7	25,8 \pm 38,1	175,8 \pm 25,3	172,8 \pm 34,1
rHis-StxB2e	Gruppen 1, 2, 5 und 7	13	18,5 \pm 20,7	166,9 \pm 21,0	164,7 \pm 25,4

Erläuterung: **BZL** = Bakterienzellysat des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24);
iFA = inkompletes Freundsches Adjuvans; **n** = Anzahl immunisierter Ferkel;
rHis-StxB2e = säulenchromatografisch aufgereinigtes rHis-StxB2e.

Im Weiteren wurden die Seren der Blutproben, die vor der 1. Impfung und 28. Tage nach der 2. Impfung den Ferkeln entnommen worden waren, auf Stx2e-neutralisierende Antikörper im Stx2e-Neutralisationstest untersucht. In keiner der untersuchten Serumproben konnten Stx2e-neutralisierende Antikörper detektiert werden. Die bei den Gruppen 3 (Bakterienzellysat und HL-3), 5 (rHis-StxB2e und inkomplettes Freundsches Adjuvans) und 6 (Kontrollgruppe) nachgewiesenen mittleren Neutralisationstiter zwischen 15,68 und 31,23 Std. _{NT} % wurden sowohl in den vor der 1. Impfung als auch in der 4 Wochen nach der 2. Impfung gewonnenen Antiseren detektiert (**Tabelle 16**).

Tabelle 16 Stx2e-neutralisierende Antikörper in Antiseren von mit rHis-StxB2e geimpften Ferkeln.
 Ergebnisse des Stx2e-Neutralisationstests; arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen vor und 28 Tage nach der zweiten Immunisierung

Ferkel-Gruppe	Impfstoff	n	Stx2e-Neutralisationstiter [Std. NT %]	
			vor Impfung	4 Wo. nach 2. Impfung
1	rHis-StxB2e mit HL-3	4	0,3 ± 1,0	0,0 ± 0,0
2	rHis-StxB2e mit ISA 266	5	4,2 ± 9,4	0,0 ± 0,0
3	BZL mit HL-3	4	23,0 ± 17,2	15,7 ± 13,0
4	BZL mit ISA 266	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
5	rHis-StxB2e mit iFA	2	31,2 ± 7,1	23,2 ± 10,2
6	Placebo mit iFA	4	24,8 ± 28,8	18,3 ± 21,1
7	rHis-StxB2e mit ISA 266 rHis-StxB2e mit iFA	2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
8	BZL mit ISA 266 rHis-StxB2e mit iFA	6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Erläuterung: **BZL** = Bakterienzellysate des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24);
iFA = inkomplettes Freundsches Adjuvans; **n** = Anzahl immunisierter Ferkel;
rHis-StxB2e = säulenchromatografisch aufgereinigtes rHis-StxB2e.

4.4 Nachweis von Stx2e-spezifischen Antikörpern bei Zuchtsauen in Hessen

Um Aussagen bezüglich der Verbreitung und Häufigkeit des Ödemkrankheitserregers in süd-hessischen Schweinezuchtbeständen treffen zu können, wurden Plasmaproben von 1.841 Zuchtsauen in insgesamt 94 Betrieben im rHis-StxB2e-ELISA untersucht.

4.4.1 Häufigkeit auf Tier- und Betriebsebenen (ELISA-Ergebnisse)

Im rHis-StxB2e-ELISA wurden von den insgesamt 1.841 untersuchten Zuchtsauen 53,2 % als serologisch positiv identifiziert. Nur bei 12,6 % der Sauen erfolgte die Eingruppierung als serologisch negativ (**Tabelle 17**). Insgesamt wurden in 93 der 94 untersuchten Schweinezuchtbetriebe serologisch positive Sauen gefunden. Nur in einem einzigen Betrieb war keine serologisch positive Sau zu finden. In diesem Betrieb waren aber noch 45,5 % der untersuchten Tiere serologisch fraglich eingestuft worden.

Tabelle 17 Seroprävalenz von Anti-Stx2e-IgG-Antikörpern bei Zuchtsauen in Südhessen
(Ergebnisse des rHis-StxB2e-ELISA, 1.841 Schweine)

serologischer Befund	Anzahl der Sauen	Anteil in %
negativ	232	12,6
fraglich	630	34,2
mittelgradig positiv	822	44,7
hochgradig positiv	157	8,5

In 87,2 % der untersuchten Betriebe reagierten mindestens 25 % der Zuchtsauen mittel- oder hochgradig positiv, in 53,2 % der Betriebe mindestens 50 % und noch in 22,3 % der Betriebe mehr als 75 % der Zuchtsauen (**Abbildung 10**).

% Betriebe

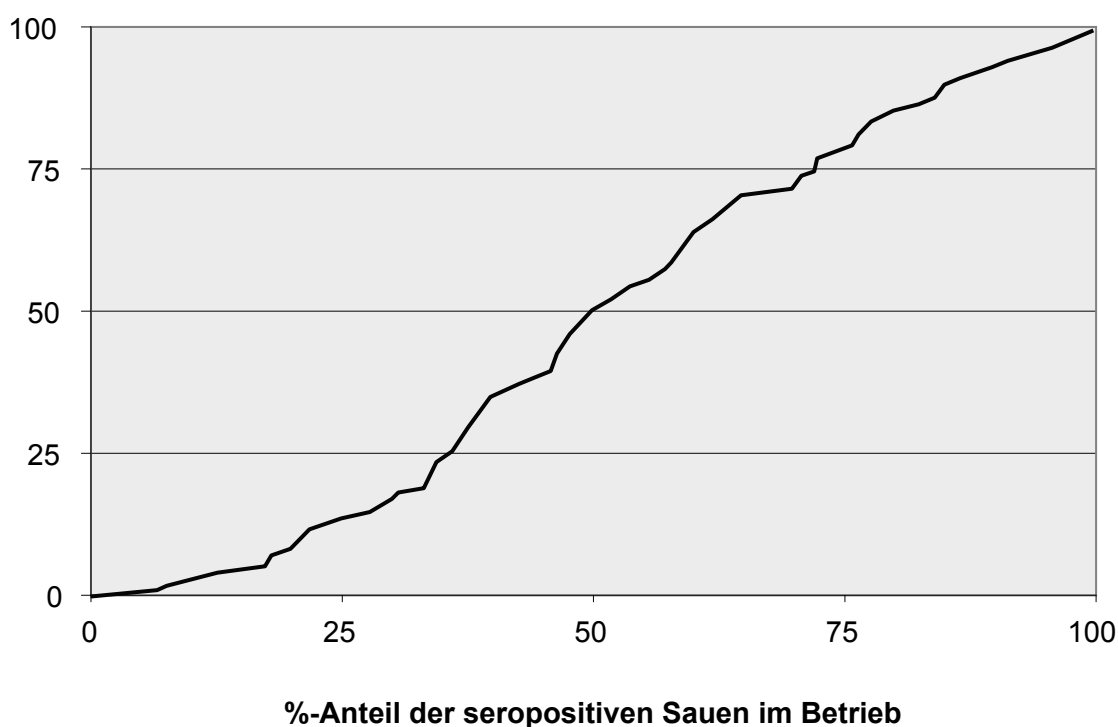


Abbildung 10 Nachweis von Serum-IgG gegen rStxB2e bei Zuchtsauen.
Kumulative Häufigkeit von Beständen mit seropositiven Sauen;
94 Bestände, Januar bis August 1997.

4.4.2 Zusammenhang zwischen betrieblichen Parametern und der Häufigkeit seropositiver Zuchtsauen im Betrieb

Anhand der mit einem Fragebogen gleichzeitig zu den Blutentnahmen erhobenen tier- und betriebsspezifischen Daten sollten mögliche Einflussfaktoren auf den StxB2e-spezifischen Antikörpertiter bzw. Prozentsatz seropositiver Sauen identifiziert werden.

Individuelle Parameter

Um individuelle Zusammenhänge zwischen den Plasma-StxB2e-IgG-Antikörpertitern und verschiedenen tierspezifischen Parametern aufzudecken, wurden das Alter (gemessen an der Anzahl der Würfe der Sauen) und der serologische Nachweis von *Sarcocystis* und *Toxoplasma* geprüft.

Hierbei wurde deutlich, dass das Alter der Sauen keinen Einfluss auf die Höhe des spezifischen StxB2e-Antikörpertiters hatte ($r = 0,023$; $p = 0,329$). Auch bestand kein Zusammenhang zwischen dem *Toxoplasma*-Befund und dem spezifischen StxB2e-Titer (Student's t-Test, $p = 0,571$). Allerdings wiesen *Sarcocystis*-positive Sauen im Mittel einen signifikant niedrigeren StxB2e-Titer als *Sarcocystis*-negative Sauen auf (Student's t-Test, $p = 0,001$; **Abbildung 11**).

Betriebsspezifische Parameter

Zur Überprüfung möglicher Einflüsse von betriebsspezifischen Parametern auf die Höhe und Häufigkeit positiver StxB2e-Antikörpertiter wurde für jeden Betrieb der mittlere innerbetriebliche StxB2e-Titer bestimmt (**Kapitel 3.8.3**). Diese innerbetrieblichen StxB2e-Titer wurden dann mittels ANOVA- und Korrelationsanalysen auf Zusammenhänge mit der geografischen Lage des Betriebes und mit Hygiene- und Management-Parametern geprüft.

Geografische Lage. Der Einfluss der Kreiszugehörigkeit der Betriebe auf den innerbetrieblichen StxB2e-Titer lag bei Vergleich aller Werte mittels ANOVA nur knapp oberhalb der statistisch signifikanten Grenze (ANOVA; $p = 0,059$). Beim explorativ durchgeführten paarweisen Mittelwertvergleich einzelner Regionen mittels Student's t-Test konnten aber signifikante Unterschiede festgestellt werden. So zeigten Betriebe in südwestlich gelegenen hessischen Landkreisen (Limburg-Weilburg-Oberland und Rheingau-Taunus-Limburg-Weilburg) signifikant niedrigere StxB2e-Titer als Betriebe, die südöstlich angesiedelt waren (Main-Kinzig, Darmstadt-Dieburg-Offenbach und Odenwald; **Abbildung 12**).

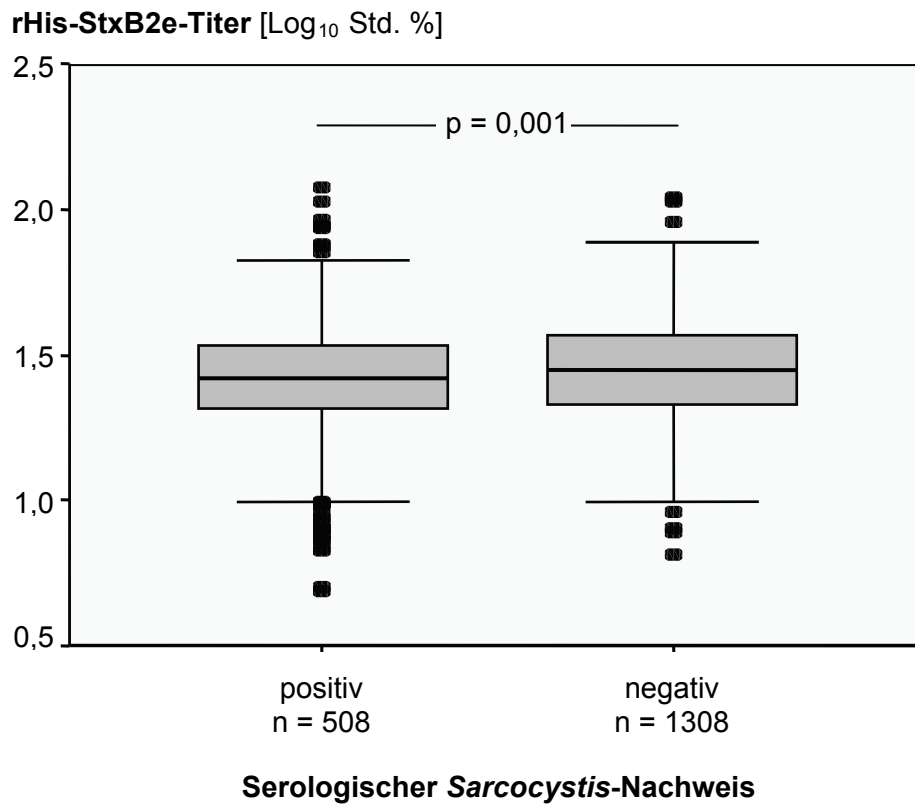


Abbildung 11 Verteilung der StxB2e-Befunde in Abhängigkeit von den serologischen *Sarcocystis*-Befunden bei Zuchtsauen.

Ergebnisse aus dem rHis-StxB2e-ELISA, n = 1.816, Box-Whisker-Plots.
Statistische Auswertung mittels ANOVA.

— Median; • Extremwerte.

Mittlerer innerbetrieblicher StxB2e-Titer [Std. %]

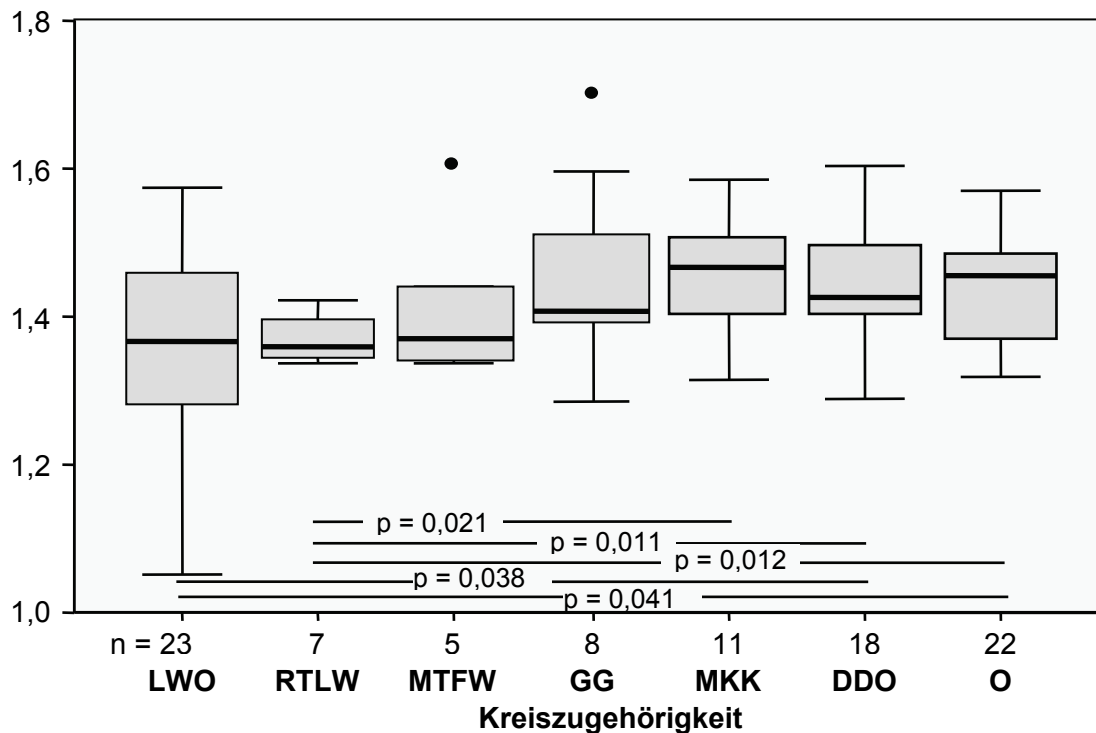


Abbildung 12 Beziehung zwischen den innerbetrieblichen rHis-StxB2e-Titern mit der Kreiszugehörigkeit bei Zuchtsauen.

Darstellung der Wertebereiche von insgesamt 94 Betrieben in Quartilen als Box-Whisker-Plots. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test.

— Median; • Extremwerte;

DDO: Darmstadt-Dieburg-Offenbach; **LWO:** Limburg-Weilburg-Oberland; **GG:** Groß-Gerau; **MKK:** Main-Kinzig-Kreis; **MTFW:** Main-Taunus-Frankfurt-Wiesbaden; **O:** Odenwald; **RTLW:** Rheingau-Taunus-Limburg-Weilburg.

Gesundheitliche und hygienische Parameter. Zur Erfassung des Hygienestatus der Betriebe standen Angaben zur Art der Stallreinigung, zum Weidegang, zur Bodenbeschaffenheit im Warte- und Abferkelstall, zum Auftreten von Diarrhoe bei Saugferkeln und Sauen in den letzten fünf Jahren sowie zu Reproduktionsproblemen bei den Sauen zur Verfügung. Außerdem lagen Daten über den Befall mit Darmparasiten (Strongyliden, Spulwurm, Peitschenwurm, Zwergfadenwurm, Kokzidien) bei den Ferkeln sowie über den Nachweis von Läusen oder Räude milben bei Sauen vor. Die Art (Benzimidazol, Levamisol, Ivermectin oder andere Mittel) und Häufigkeit der Entwurmung der Saugferkel bzw. Sauen und die Behandlung mit Organphosphaten waren ebenfalls erhoben worden.

Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen der Bodenbeschaffenheit im Wartestall und dem innerbetrieblichen StxB2e-Titer (ANOVA, $p = 0,042$). So hatten Zuchtsauen, die auf Boden mit Einstreu gehalten wurden, einen niedrigeren StxB2e-Titer als Sauen, die auf Spaltenboden gehalten wurden (Dunn, $p = 0,029$). Die Haltung auf einem gemischten

Bodenbelag oder auf spaltenlosem Boden ohne Einstreu hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die innerbetriebliche Titerhöhe (Dunn, $p > 0,05$; **Abbildung 13**).

Der Befall mit Läusen in den Betrieben stand statistisch ebenfalls in Zusammenhang mit dem innerbetrieblichen StxB2e-Titer. So zeigten Betriebe, in denen die Zuchtsauen mit Läusen befallen waren, im Durchschnitt einen höheren StxB2e-Titer im Vergleich zu Betrieben, in denen keine Läuse nachgewiesen worden waren (Student's t-Test, $p = 0,022$; **Abbildung 14**).

Die übrigen geprüften Hygiene-Parameter zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe des innerbetrieblichen StxB2e-Titers (**Tabelle 18**).

Mittlerer innerbetrieblicher StxB2e-Titer [Std. %]

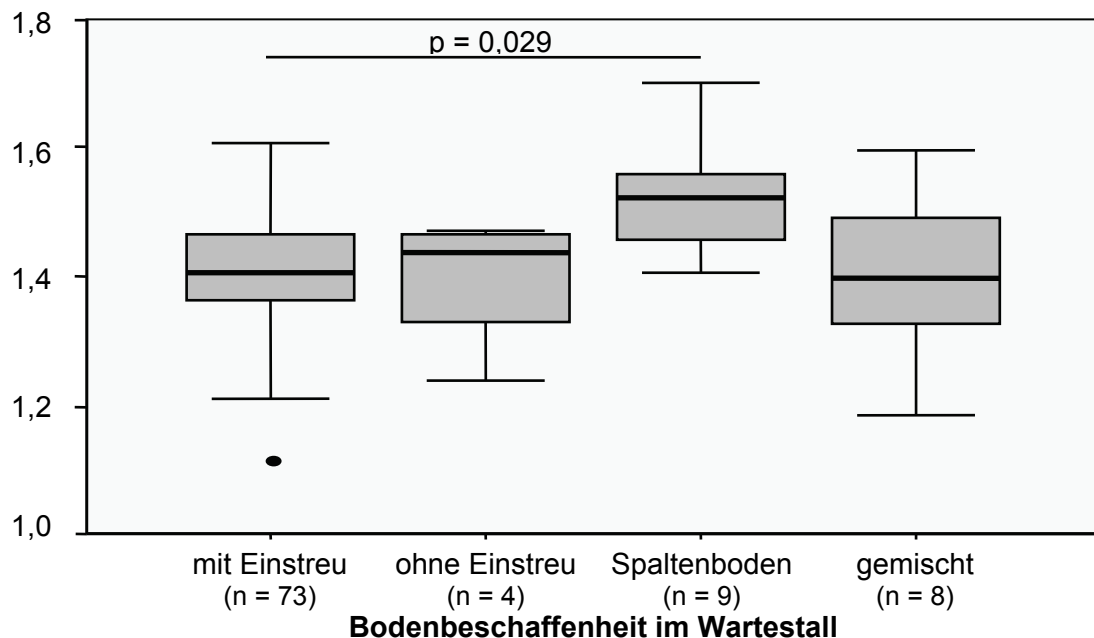
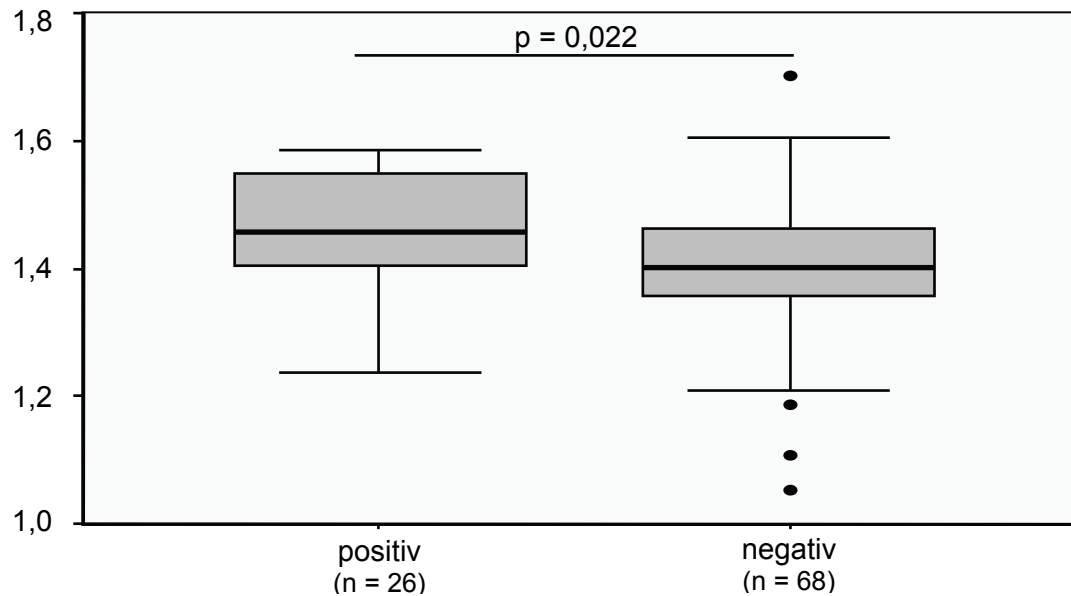


Abbildung 13 Beziehung zwischen dem innerbetrieblichen StxB2e-Titer und der Bodenbeschaffenheit im Wartestall.

Darstellung der Wertebereiche von insgesamt 94 Betrieben in Quartilen als Box-Whisker-Plots. Statistische Auswertung mittels ANOVA.

— Median; • Extremwerte.

Mittlerer innerbetrieblicher StxB2e-Titer [Std. %]



Nachweis von Läusen in den letzten 5 Jahren

Abbildung 14 Beziehung zwischen dem innerbetrieblichen StxB2e-Titer und dem Befall der Zuchtsauen mit Läusen in den letzten 5 Jahren.

Darstellung der Wertebereiche von insgesamt 94 Betrieben in Quartilen als Box-Whisker-Plots. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test.

— Median; • Extremwerte.

Tabelle 18 Parameter für den Hygienestatus von Zuchtsauenbetrieben ohne signifikanten Einfluss auf den mittleren innerbetrieblichen StxB2e-Titer

geprüfte Parameter	Signifikanz ¹⁾ [p-Wert]
Reinigungsmethode im Stall nur Ausmisten / Hochdruckreinigung / Reinigung und chemische Desinfektion	0,686
Bodenbeschaffenheit im Abferkelstall Spaltenboden, mit / ohne Einstreu, Mischboden	0,290
Weidegang der Sauen ja / nein	0,208
Durchfall bei Saugferkeln in den letzten 5 Jahren ja häufig / ja gelegentlich / nein / nicht bekannt	0,788
Durchfall bei Sauen in den letzten 5 Jahren ja häufig / ja gelegentlich / nein / nicht bekannt	0,820
Reproduktionsprobleme bei Sauen in den letzten 5 Jahren häufiges Umrauschen / Frühgeburten u/o Aborten / lebensschwache Ferkel / andere / keine	0,960
Darmparasiten bei Sauen und/oder Ferkeln in den letzten 5 Jahren Strongyliden, Spulwurm, Peitschenwurm, Zwergfadenwurm, Kokzidien, keine	0,727
Räude in den letzten 5 Jahren ja / nein	0,414
Entwurmungen der Saugferkel in den letzten 5 Jahren ja / nein	0,852
Entwurmungen der Sauen in den letzten 5 Jahren ja / nein	0,220
Verabreichung von Levamisol ja / nein	0,463
Sauen-Entwurmungen mit Benzimidazolen ja / nein	0,422
Sauen-Entwurmungen mit Ivermectin ja / nein	0,123
Sauen-Entwurmungen mit anderen Mitteln Piperazin / Organphosphate / nein	0,210
Behandlung mit Organphosphaten ja / nein	0,818

¹⁾ Mittelwertvergleiche mittels ANOVA bzw. Student's t-Test

Parameter der Betriebsorganisation

In einem weiteren Schritt wurden auch Daten des Managements auf einen möglichen Zusammenhang hinsichtlich der innerbetrieblichen StxB2e-Titer geprüft. Zur Verfügung standen Daten über die Betriebsart und Bedeutung der Sauenhaltung für den Betrieb. Auch die Herkunft der Sauen, die Anzahl der Sauen in einem Betrieb sowie die Art des Futters und der Fütterung wurden berücksichtigt. Zudem wurden Reproduktionsparameter wie die Anzahl der Geburten und der aufgezogenen Ferkel je Sau und Jahr sowie das durchschnittliche Absetzalter der Ferkel auf einen möglichen Einfluss auf den durchschnittlichen StxB2e-Titer im Betrieb in die statistische Analyse einbezogen.

Zwischen dem durchschnittlichen Absetzalter der Ferkel (gemessen in Lebenswochen) und dem innerbetrieblichen StxB2e-Titer bestand eine signifikant negative Korrelation. Der StxB2e-Titer war im Durchschnitt umso niedriger, je später die Ferkel durchschnittlich von der Muttersau abgesetzt wurden ($r = -0,256$; $p = 0,013$; **Abbildung 15**).

Für keinen der anderen acht Management-Parameter konnte ein signifikanter Zusammenhang mit dem innerbetrieblichen StxB2e-Titer nachgewiesen werden (**Tabelle 19**).

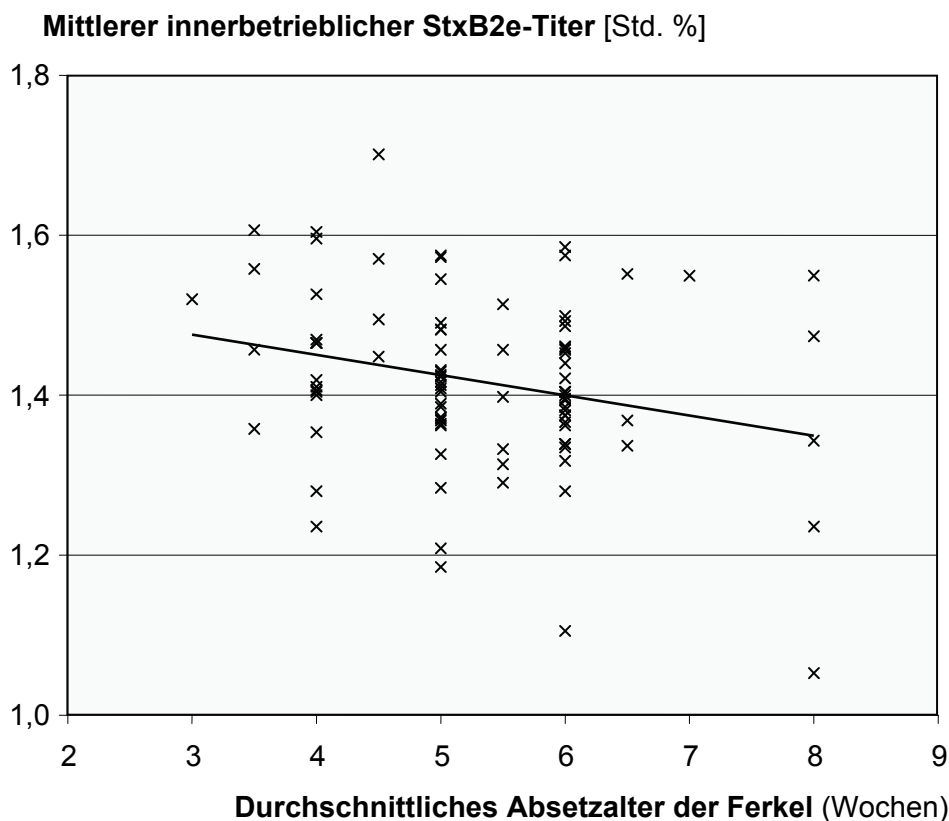


Abbildung 15 Zusammenhang zwischen dem innerbetrieblichen rHis-StxB2e-Titer und dem durchschnittlichen Absetzalter der Ferkel im Betrieb.

Werte von 94 Betrieben; $y = -0,0255x + 1,553$; $r = -0,256$, $p = 0,013$.

Tabelle 19 Zusammenhang zwischen innerbetrieblichem StxB2e-Titer und verschiedenen Management-Parametern.

geprüfte Parameter	Signifikanz [p-Wert]
Betriebsart Herdbuchzucht / geschlossener Betrieb / Mastferkelproduzent	0,491 ¹⁾
Bedeutung der Sauenhaltung für den Betrieb Hauptbetrieb / Mischbetrieb / Nebenerwerb	0,651 ¹⁾
Herkunft der Sauen eigene Nachzucht / Zukauf / eigene Nachzucht und Zukauf	0,450 ¹⁾
Anzahl der Zuchtsauen im Betrieb	0,272 ²⁾
Futterart flüssiges Futter / Schrot oder Pellets / gemischt	0,934 ¹⁾
Fütterung der Sauen automatisch / manuell / verschiedene Systeme	0,751 ¹⁾
Anzahl der aufgezogenen Ferkel je Sau und Jahr	0,486 ²⁾
Anzahl der Geburten je Sau und Jahr	0,898 ²⁾

Erläuterung: ¹⁾ Mittelwertvergleiche mittels ANOVA; ²⁾ Korrelationsanalyse nach Pearson

Multifaktorielle Analyse

Um den Zusammenhang zwischen dem innerbetrieblichen StxB2e-Titer und mehreren Betriebsparametern gleichzeitig zu untersuchen, wurde eine multiple schrittweise Kovarianzanalyse (ANCOVA) ohne Wechselwirkung zwischen qualitativen sowie quantitativen Einflussvariablen durchgeführt.

Eine signifikante Beziehung bestand zwischen dem innerbetrieblichen StxB2e-Antikörpertiter und dem durchschnittlichen Absetzalter der Ferkel, dem Lausbefund in den letzten 5 Jahren sowie der Kreiszugehörigkeit ($p = 0,037$). Die anderen Betriebsparameter waren bei diesem Verfahren nicht signifikant mit der Höhe des mittleren innerbetrieblichen StxB2e-Titers assoziiert (**Tabelle 20**).

Tabelle 20 Resultat der multiplen, schrittweise durchgeführten Kovarianzanalyse mit den innerbetrieblichen Einflussvariablen.

Einflussfaktor	Signifikanz [p-Wert]
Durchschnittliches Absetzalter der Ferkel	0,004
Befall mit Läusen in den letzten 5 Jahren	0,002
Kreiszugehörigkeit	0,037

4.4.3 Nachweis von Stx2e-neutralisierenden IgG-Antikörpern in Plasmaproben

Im Stx2e-Neutralisationstest wurde untersucht, inwieweit die mittels rHis-StxB2e-ELISA gefundenen StxB2e-spezifischen Antikörper in der Lage sind, die für Verozellen toxische Wirkung des Stx2e zu neutralisieren. Diese Neutralisation wurde anhand der vorhandenen Stoffwechselaktivität der Verozellen mittels MTT gemessen und mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers BC5 BB12, der die zytotoxische Wirkung von Stx2e vollständig neutralisiert, standardisiert. In dieser Untersuchung wurden 200 der 1.841 im rHis-StxB2e-ELISA untersuchten Plasmaproben aus Südhessen eingesetzt. Die 200 Plasmaproben wurden dahingehend ausgewählt, dass je 50 Proben die im rHis-StxB2e-ELISA "negativen", "fraglichen", "mittelgradig positiven" und "hochgradig positiven" Serumproben repräsentierten.

Wie die **Abbildung 16** zeigt, konnte mit der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Serum-IgG-StxB2e-Titer und der Fähigkeit der Plasmaproben, das Stx2e zu neutralisieren, nachgewiesen werden ($r_s = -0,007$, $p = 0,920$). Selbst unter den mit dem rHis-Stx2e-ELISA als hochgradig positiv eingestuften Plasmaproben konnte im Stx2e-Neutralisationstest nur eine einzige Probe das eingesetzte Stx2e neutralisieren, und auch nur soweit, dass die Vitalität der Verozellkulturen nach 96 h Inkubation im Vergleich zum Kontrollansatz 50,4 % betrug.

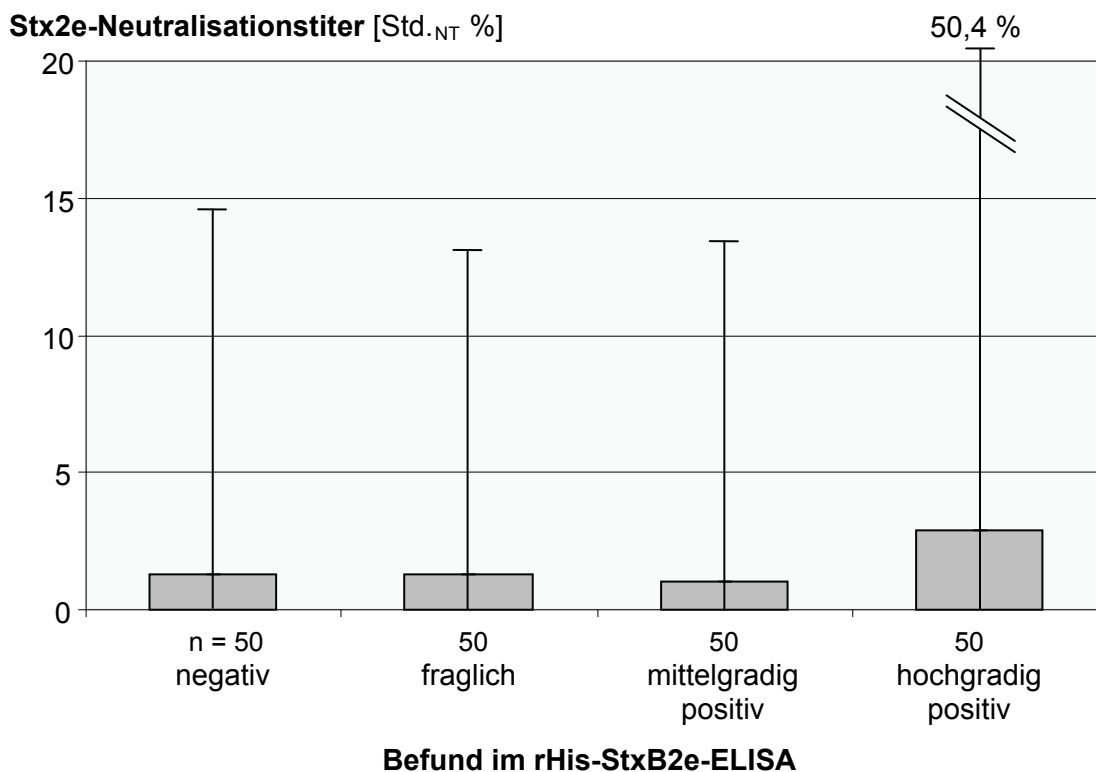


Abbildung 16 Korrelation zwischen StxB2e-bindenden und Stx2e-neutralisierenden Antikörpern in Plasmaproben von Schweinen (n = 200).

Ergebnisse der Plasmaproben im rHis-StxB2e-ELISA und im Stx2e-Neutralisationstest, Box-Whisker-Plots. Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman $r_s = -0,007$, $p = 0,920$. Mittelwert, Maximum, Minimum.

5 DISKUSSION

Die Untersuchung hatte zum Ziel, anhand eines serologischen Testsystems aktuelle Daten zu Verbreitung und Häufigkeit der Ödemkrankheit bei Schweinen in Südhessen zu ermitteln. Hierfür sollten (1) zunächst mittels genotypischer Charakterisierung von Ödemkrankheitserregern geeignete Testantigene identifiziert, (2) ein serologisches Testsystem etabliert und evaluiert und (3) die Seroprävalenz von EDEC bei Zuchtsauen in Südhessen ermittelt werden.

Charakterisierung von porcinen STEC-Isolaten

Zur Charakterisierung von STEC standen 1.428 *E. coli*-Isolate von 975 Schweinen aus Deutschland zur Verfügung. Mit einem PCR-Vorauswahl-Verfahren (**Bosworth and Casey, 2009**) wurden insgesamt 164 Isolate (11,5 %) identifiziert, die ein Gen aus der *stx2*-Gruppe besaßen und daher zunächst als "STEC-2" bezeichnet wurden. Ein nahezu gleicher prozentualer Anteil (11,3 %) von *stx2e*-positiven *E. coli* an allen untersuchten *E. coli*-Isolaten wurde unlängst in Serbien im Rahmen einer Feldstudie beobachtet (**Čobeljčić et al., 2005**). In einer älteren Studie in Deutschland konnten *Stx2e*-bildende *E. coli* von 27,5 % der erkrankten und von 3,8 % der gesunden Schweine verschiedener Altersgruppen isoliert werden (**Appel et al., 1989**). Vergleiche der Häufigkeit oder sogar Prävalenz von *stx2e*-positiven *E. coli* in verschiedenen Studien lassen sich aber nur bedingt anstellen. Dies ist mit den Unterschieden in den jeweils beprobten Populationen (kranke *versus* gesunde Tiere) und den verwendeten Nachweissystemen (phänotypischer Nachweis z.B. mittels Zellkultur *versus* molekulargenetischer Nachweis z.B. mittels PCR) begründbar. Mit einer allelspezifischen PCR (*stx2e*-PCR) konnte in allen 164 Isolaten der vorliegenden Studie das *stx2e*-Gen identifiziert werden, welches für den bei Schweinen vorherrschenden Shigatoxin-Typ 2e kodiert (**Blanco et al., 2006; Fratamico et al., 2004; Osek, 1999b**). Damit können bei der Beurteilung der Seroprävalenz der Ödemkrankheitserreger auf der Grundlage eines serologischen Testsystems mit *Stx2e* als Testantigen Kreuzreaktivitäten zwischen dem Testantigen und Antikörpern gegen andere Shigatoxin 2-Typen als vernachlässigbar eingestuft werden. Dies ist damit begründbar, dass andere Shigatoxin 2-Typen bei Schweinen in Deutschland gar nicht oder nur sehr selten vorkommen.

Insgesamt 153 der 164 Isolate (93,3 %) zeigten bei der Anzucht auf Blutagarplatten einen α -hämolytischen Phänotyp. Dies lag im Erwartungsbereich, da EDEC laut Literatur zu 82 % bis 100 % α -Hämolysin bilden (**Gallien et al., 1994; Gannon et al., 1988; Osek et al., 1999**). Die O-Typisierung der *stx2e*-positiven Isolate erfolgte durch Objektträgerschnellagglutination mit ausgewählten Testseren. Hierfür wurden Testseren mit Spezifitäten für sieben O-Antigene verwendet, welche häufig bei EDEC (O138, O139, O141) oder bei ETEC (O8, O147, O149, O157) von Schweinen nachgewiesen wurden (**Gannon et al., 1988; Gannon and Gyles, 1990; Nagy and Fekete, 1999**). Obwohl nur diese kleine Auswahl an Testseren verwendet wurde, konnte der O-Typ bei 139 der 164 *stx2e*-positiven Isolate (84,8 %) bestimmt werden. Ähnlich wie in vorangegangenen Untersuchungen anderer Autoren, dominierten auch in der vorliegenden Studie STEC-Stämme mit den O-Antigenen O141 (51,2 %), O139 (19,5 %) und O138 (7,9 %). Da EDEC-Stämme dieser O-Gruppen bislang nur beim Schwein beobachtet wurden, geht man davon aus, dass es sich um hochgradig an

diese Tierart adaptierte *E. coli*-Stämme handelt. (Blanco et al., 1983; Dobrescu, 1983; Gregory, 1955; Gyles et al., 1988; Johnson et al., 1990; Linggood and Thompson, 1987; Mainil et al., 1989; Nielsen, 1986; Schofield and Schroder, 1954; Smith et al., 1983; Sojka et al., 1957; Sojka et al., 1960). *E. coli*-Isolate mit den O-Antigenen O147 (4,3 %), O149 (1,2 %) und O157 (0,6 %) konnten in der vorliegenden Studie nur in jeweils geringem Umfang identifiziert werden. Vor kurzem wurde über eine Häufung von Ödemkrankheit in den USA berichtet, wobei bis zu 42 % der Fälle durch *E. coli*-Stämme des O-Typs O147 verursacht wurden (Helgersen et al., 2006). Die US-amerikanischen O147-Isolate wiesen neben *stx2e* und *fedA* auch die Enterotoxingene *estap* und *estb* auf. In der vorliegenden Untersuchung waren 25 Isolate nicht typisierbar, da sie mit keinem oder mehr als einem der verwendeten Testseren reagierten. Hier könnte eine vollständige Serotypisierung Aufschluss darüber geben, ob diese Isolate O-Antigene besitzen, welche bei einigen humanen STEC-2e-Isolaten nachgewiesen wurden, wie z.B. O8 oder O101 (Friedrich et al., 2002b; Sonntag et al., 2005).

Die von uns als *stx2e*-positiv getesteten 164 STEC-2-Isolate wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von Genen für Toxine (*E. coli*-Enterotoxine LT-I, ST-Ip und ST-II), Fimbrien (F4-, F5-, F6-, F18- und F41-Fimbrien) und den Adhäsionsfaktor Intimin untersucht. Das *fedA*-Gen, welches für das Hauptstrukturprotein der F18-Fimbrien (Rippinger et al., 1995) kodiert, war bei 146 Isolaten (89,0 %) nachweisbar. Gene für F4-, F5-, F6- oder F41-Fimbrien sowie das *eae*-Gen (kodiert für Intimin) konnten dagegen bei keinem einzigen Isolat nachgewiesen werden. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen überein, in denen von Schweinen ebenfalls überwiegend *fedA*-positive STEC-2e isoliert wurden, dagegen die anderen Adhäsionsfaktoren nicht oder nur sehr vereinzelt vorkamen (Aarestrup et al., 1997; Frydendahl, 2002). Von den 146 *fedA*-positiven STEC-2e gehörten 124 den O-Gruppen O138 (8,1 %), O139 (25,0 %) bzw. O141 (66,9 %) an und wiesen alle, bis auf eine Ausnahme, α -Hämolysin auf. Diese Isolate können somit als typische Ödemkrankheitserreger (EDEC) eingestuft werden (Bertschinger et al., 1990; Imberechts et al., 1992; Imberechts et al., 1994; Ojeniyi et al., 1994; Wittig et al., 1994; Wittig et al., 1995).

Ungefähr die Hälfte der STEC-2-Isolate (n = 89; 54,3 %) besaß zusätzlich zum *stx2e*-Gen auch Gene für *E. coli*-Enterotoxine. Dabei dominierte das hitzestabile Enterotoxin ST-II (52,4 %), gefolgt von dem hitzelabilen Enterotoxin LT-I (40,9 %) und dem hitzestabilen Enterotoxin ST-Ip (18,3 %). Die Assoziation von *stx2e* und Enterotoxingenen wurde bereits mehrfach beschrieben und konnte in dieser Studie nun auch für deutsche bzw. hessische Zuchtsauenbestände bestätigt werden (Bosworth et al., 1998; Gannon et al., 1988; Garabal et al., 1996; Sarrazin et al., 2000). Ähnlich wie in anderen europäischen Ländern wurden Enterotoxingene vorrangig bei *stx2e*-positiven Isolaten vom Serotyp O141 nachgewiesen, wogegen Enterotoxingene bei keinem Isolat vom Serotyp O139 vorhanden waren (Boss et al., 1992; Imberechts et al., 1994; Mainil et al., 1989; Nagy et al., 1999; Sarrazin et al., 2000). Von den *fedA*-positiven Isolaten besaßen 85 (58,2 %) Gene für Enterotoxine. Davon gehörten 63 Isolate dem O-Typ O141 und 5 Isolate dem O-Typ O138 an. Auch wenn sowohl der *fed*-Lokus für die F18-Fimbrien als auch die hitzestabilen Enterotoxine plasmidkodiert sind, so handelt es sich doch um unterschiedliche Plasmide

(Fekete et al., 2003). Die Lokalisation auf Plasmiden und die Möglichkeit zum horizontalen Gentransfer sind vermutlich Ursachen, warum diese Virulenzfaktoren bei verschiedenen klonalen *E. coli*-Linien vorkommen.

Die genotypische Charakterisierung der *stx2e*-positiven Isolate von Schweinen aus Deutschland zeigte, dass neben dem Shigatoxin Typ 2e kein Faktor gebildet wird, der bei allen Isolaten vorhanden ist. Selbst die bisher als hochgradig charakteristisch angesehenen F18-Fimbrien und das α -Hämolysin konnten zwar bei einem Großteil der Isolate (88,4 % bzw. 93,3 %), aber nicht bei allen Isolaten detektiert werden. Der einzige Marker, der tatsächlich bei allen EDEC-Stämmen vorkommt, ist nach allen bisherigen Untersuchungen einschließlich der hier vorgelegten Daten einzig das Stx2e bzw. sein Gen. Im Hinblick auf die Entwicklung eines Testsystems, mit dem EDEC-spezifische Antikörper bei Schweinen nachgewiesen werden können, bedeutet dies, dass sich vorrangig das Stx2e als Testantigen anbietet. Man könnte zwar einwenden, dass bei der Verwendung von Stx2e auch Infektionen mit anderen STEC-Stämmen erfasst werden, und zwar STEC-Stämme, die ein anderes Shigatoxin der Gruppe 2 bilden als Stx2e; denn wahrscheinlich reagieren alle Toxine der Stx2-Gruppe untereinander serologisch kreuz. Jedoch zeigen die Daten dieser und anderer Studien, dass STEC mit anderen Stx2-Typen bei Schweinen nicht oder nur selten vorkommen.

Rekombinante Herstellung der B-Untereinheit von Stx2e

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Stx2e-ELISA sowie die Entwicklung eines potenziellen Impfstoffes zur Prophylaxe der Ödemkrankheit bei Ferkeln. Stx2e als hoch potentes Toxin ist bereits in geringer Dosis bei intravenöser Applikation ausreichend, um die Ödemkrankheit beim Ferkel auszulösen (MacLeod et al., 1991). Da bei der B-Untereinheit der Stx2e keine Toxizität besteht, kam diese Untereinheit als mögliches Impfantigen in Frage. Weiterhin sollte die aufgereinigte B-Untereinheit (rHis-StxB2e) als Fangantigen im ELISA eingesetzt werden. Durch Lege (2003) wurde ein Fusionsprotein generiert, das aus dem StxB2e-Molekül und einer N-terminalen Histidin-Marker-Sequenz bestand. Das rHis-StxB2e wies im Vergleich zu einem mit Glutathion-S-Transferase markierten StxB2 (Gunzer and Karch, 1993) bzw. StxB2e (Franke et al., 1995a) eine größere Stabilität auf (S. Franke und N. Lege, 2000, persönliche Mitteilung). Die große Stabilität wiederum bedingt eine Verbesserung der Extraktion und Reinigung. Durch die rekombinante Herstellung des rHis-StxB2e können somit höhere Ausbeuten bei der Aufreinigung erzielt werden.

Vor Versuchsbeginn wurde eine Identitätsprüfung des rHis-StxB2e-exprimierenden *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) (Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere; Lege, 2003) durchgeführt. Die Erstellung des Plasmidprofils des Stammes (Nachweis eines Plasmides von 8,6 MDa) und die Gewinnung eines, das *stxB2e*-Insert umgreifenden, pET-A/pET-B-Amplifikates (ca. 440 bp) ergaben eine Übereinstimmung mit den theoretischen Daten. Diese bestätigten das Vorhandensein des *stxB2e*-Fragments in BL21(DE3, pHIT-IV-24). Letztlich wurde die Identität des Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) durch Nukleotid-Sequenzanalyse und Vergleich mit der publizierten *stxB2e*-Nukleotidsequenz von *E. coli* Stamm S1191 eindeutig belegt (Weinstein et al., 1988).

Für die phänotypische Prüfung der Expression, Identität und Reinheit des rHis-StxB2e-Antigens wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3, pHIT-IV-24) unter Carbenicillin-Selektionsdruck und IPTG-Induktion angezüchtet. Dann folgte eine Analyse des Zelllysates mittels Tricine-PAGE und Westernblot. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung der Proteinprofile war eine prominente Proteinbande zu erkennen, die trotz der Diskrepanz zwischen der für sie gemessenen molekularen Masse (8,4 kDa) und der für das rHis-StxB2e errechneten Masse (10,2 kDa) als eben dieses Protein angesehen wurde. Hierfür sprach, dass das prominente Protein offenbar die erwartete Histidin-Markierung trug, denn es vermochte das Ni^{2+} -NTA-POD-Konjugat zu binden, wie es mittels Westernblot-Technik demonstriert werden konnte. Ein noch stärkerer phänotypischer Beleg, dass es sich bei der genannten Proteinbande um das erwünschten rekombinant erzeugte rHis-StxB2e handelte, war die Bindung des StxB2e-spezifischen monoklonalen Antikörpers 5G10 im Immunoblot-Verfahren. Es ist zu vermuten, dass die Abweichung zwischen gemessener und errechneter molekularer Masse technisch bedingt war. Die mit dem verwendeten Herolab-System vorgenommene Messung basiert auf der Densitometrie, bei der Farbdichten (Volltondichten) im Gel quantifiziert werden. Das Bildverarbeitungssystem erfasst hierbei die Farbmenge pro Flächeneinheit anhand von Tonwerten. Proteinbanden, die infolge der manuellen Auftragstechnik, wegen Überladungseffekten oder durch asymmetrische bzw. ungleichmäßige elektrische Felder unscharf, verzerrt oder verbreitert sind, können deshalb zu stark abweichenden Messergebnissen führen. Bei der manuellen Vermessung der fraglichen Bande anhand des Molekularmassenstandards SeeBlue™ war die Diskrepanz zwischen gemessener und errechneter molekularer Masse deutlich geringer.

Das Testsystem zum Nachweis EDEC-spezifischer Antikörper bei Schweinen sollte möglichst spezifisch sein. Aus diesem Grunde wurde ein möglichst reines Testantigen angestrebt, das vor allem keine sonstigen *E. coli*-Antigene mehr enthalten sollte. Die Isolierung und Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins erfolgten daher affinitätschromatografisch an einer Ni^{2+} -NTA-Matrix. Nach Zellaufschluss und Zentrifugation erfolgte der Aufschluss der Sedimente mit einem Harnstoff-Lysepuffer, da insbesondere kleine Proteine wie das rHisStxB2e während der Zentrifugation mit größeren Proteinen interagieren können und von diesen "ummantelt" werden. Dies kann in den Bakterien zur Ausbildung von unlöslichen Proteinaggregaten (sogenannten Einschlusskörperchen) führen. Zusätze von Harnstoff oder auch Guanidin denaturieren durch Aufbrechen der Wasserstoffbrücken die größeren "Hüllproteine" der Aggregate und setzen die eingeschlossenen niedermolekularen Proteine wie rHis-StxB2e frei. Allerdings denaturieren bei diesem Vorgang leider auch die eigentlichen Zielproteine. Da rHis-StxB2e in solchen Einschlusskörperchen vorlag, war der Aufreinigungsweg unter denaturierenden Bedingungen nicht zu umgehen. Die Elution des Fusionsproteins aus der Ni^{2+} -NTA-Matrix erfolgte bei den hier beschriebenen Untersuchungen mit einem sauren Elutionspuffer (pH 3,0), welcher die Protonierung des Imidazolrings im Histidin bewirkte. Der protonierte Stickstoff kann somit nicht mehr als Koordinationspartner fungieren und das Fusionsprotein löst sich von der Matrix. Alternativ könnte auch Imidazol, welches den His-Tag kompetitiv aus dem Ni^{2+} -Chelat-Komplex verdrängt, eingesetzt werden (Anonym, 2003b).

Bei der Analyse der verschiedenen Fraktionen des Eluats zeigte sich, dass rHis-StxB2e mit dem gewählten chromatografischen Verfahren hochgradig rein aus dem Bakterienzellysat gewonnen wurde. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 4 mg rHis-StxB2e pro Liter Bouillon der Ausgangskultur. Angesichts des hohen Reinheitsgrades des isolierten rHis-StxB2e kann diese Ausbeute im Vergleich zu Angaben in der Literatur als gut angesehen werden. So berichten Autoren über die unvollständige Aufreinigung Histidin-markierter Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie. Als Beispiele seien rSpvD-His von *Salmonella* Typhimurium (**Barth, 2003; Bauerfeind, 1999**), rSpvR-His von *Salmonella* Dublin (**Grob and Guiney, 1996**) oder N-Hydroxyarylamino-O-Acetyltransferase von *Salmonella* Typhimurium (**Sinclair et al., 1998**) genannt. In diesen Studien wurden nach affinitätschromatografischer Aufreinigung über eine Ni²⁺-NTA-Matrix zwar Ausbeuten von 6 - 10 mg Fusionsprotein pro Liter Bouillonkultur erreicht, jedoch waren mit der SDS-PAGE Verunreinigungen in den Lösungen nachweisbar. **Barth (2003)** gelang es erst in einem zweiten Aufreinigungsschritt mittels präparativer SDS-PAGE 2,3 mg hochgradig reines Fusionsprotein pro Liter zu gewinnen. Auch in der hier vorgelegten Studie war im Verlauf der Chromatographie von rHis-StxB2e ein beträchtlicher Anteil des Fusionsproteins im Durchlauf nachweisbar. Für künftige Untersuchungen ist deshalb eine Optimierung des Verfahrens, z.B. durch die Veränderung der Affinitätsmatrix oder der Puffersysteme, in Betracht zu ziehen.

Etablierung des rHis-StxB2e-ELISA

Mit dem aufgereinigten rHis-StxB2e-Antigen wurde ein indirekter ELISA-Test etabliert. Um den rHis-StxB2e-ELISA zu evaluieren, wurden die Intra- und Interassaypräzision des Testsystems bestimmt. Zur Erfassung der Sensitivität des rHis-StxB2e-ELISAs wurden polyclonale Schweinehyperimmunseren verwendet, die Stx2e *in vitro* neutralisieren konnten. Für die serologische Befundung von Seren wurden außerdem Grenzwerte ermittelt.

Die Intraassaypräzision (Ergebnisvarianz) des rHis-StxB2e-ELISA wurde dadurch ermittelt, dass drei hoch-, zwei mittel- und fünf niedrigtitrige Seren jeweils in Mehrfachansätzen getestet wurden. Um gut reproduzierbare Ergebnisse zu liefern, sollte der Variationskoeffizient in ELISA-Resultaten den Wert um 20 % nicht überschreiten (**Spencer and Nicoloff, 1990**). Neun der 10 Testseren wurden dieser Anforderung gerecht. Nur eine Serumprobe überschritt mit einem Variationskoeffizienten von 22,0 % diese Vorgabe knapp. Ebenso wurde die Interassaypräzision (Varianz der rHis-StxB2e-ELISA-Ergebnisse bei zeitlich getrennter Prüfung) überprüft, indem 10 Serumproben jeweils an 10 verschiedenen Tagen getestet wurden. Fünf Serumproben (hoch- und mitteltitrig) ergaben einen Variationskoeffizient unter 20 % und belegten somit die geforderte Reproduzierbarkeit. Vier andere Testseren wiesen bei niedrigem Antikörpertiter Variationskoeffizienten zwischen 23,3 und 70,9 % auf und lagen somit über dem Grenzwert. Die 1:800 verdünnte Serumprobe "R-1384/00" zeigte mit einem Variationskoeffizienten von 57,5 % eine deutliche Überschreitung des Grenzwertes. Ein niedriger Antikörpertiter korrelierte somit mit einem hohen Variationskoeffizienten. Dies ist dadurch erklärbar, dass sich bei niedrigen Titern aufgrund des kleinen Signals bereits geringe, technisch bedingte Messwertschwankungen sehr stark auf den Variationskoeffizienten auswirken. Aus diesem Grund wurden die höheren Variationskoeffizienten bei Titern unter 20 % toleriert. Außerdem wurden anschließend alle

Schweineserumproben ausschließlich bei einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Auch **Lege (2003)** ermittelte im StxB2e-ELISA eine optimale Serumverdünnung für hoch- bis niedrigtitrige Seren von 1:100, da Titerunterschiede zwischen Serumproben in dieser Verdünnung am deutlichsten waren. Gleichzeitig waren selbst hochtitrige Seren messtechnisch noch zu erfassen.

Zur serologischen Befundung von Serumproben in serologisch positiv und negativ wurden Grenzwerte (Cut-Off-Werte) festgelegt. Dazu wurden 136 Serumproben von 3,5 bis 5,5 Wochen alten Ferkeln eine Woche vor dem Absetzen verwendet. Nach den vorausgegangenen Untersuchungen von **Lege (2003)** war zu erwarten, dass die Ferkel serologisch negativ reagieren, da maternale Antikörper nicht mehr und eigene Antikörper noch nicht vorhanden waren. 106 Serumproben stammten aus vier hessischen Betrieben, in denen in den letzten 3 Jahren vor der Blutentnahme ein Verdacht auf Ödemkrankheit nicht bestand (82 Serumproben aus 3 Betrieben) bzw. ausgeschlossen wurde (24 Serumproben aus 1 Betrieb). Zudem wurden 30 Serumproben aus einem polnischen Betrieb, welcher hinsichtlich Ödemkrankheit als unverdächtig eingestuft war, in die Untersuchung einbezogen. Im Ergebnis wurden für alle diese Serumproben im ELISA sehr niedrige Messwerte von 0,7 bis 12,1 Std. % ermittelt. Der Mittelwert betrug 8,3 Std. %, die Standardabweichung 8,8 Std. %. Anhand dieser beiden Werte wurden dann die Grenzwerte für die serologische Eingruppierung der Proben in negativ, fraglich, mittelgradig positiv und hochgradig positiv berechnet.

Zur Überprüfung der Sensitivität des rHis-StxB2e-ELISA für den Nachweis von StxB2e-spezifischen Antikörpern wurden sieben polyklonale Hyperimmunseren von Schweinen getestet. Die Seren stammten von Schweinen, die mit Formaldehyd-inaktivierten Kulturüberständen von Stx2e-exprimierenden *E. coli*-Stämmen immunisiert worden waren und von denen bekannt war, dass sie *in vitro* die zytotoxische Wirkung von Stx2e neutralisieren können (**Alexa et al., 1998**). In jeder Serumprobe wurden IgG-Antikörper gegen StxB2e festgestellt, und zwar in Konzentrationen, die mit 52,8 bis 178,9 Std. % weit über dem Cut-Off für die Einteilung in serologisch negativ und positiv lagen. An diesen sieben Testseren erwies sich der etablierte ELISA demnach als absolut sensitiv.

Antigenität und Immunogenität von rHis-StxB2e

Zur Prüfung der Eignung von rHis-StxB2e als Impfantigen (Induktion spezifischer Antikörper) wurden drei verschiedene Immunisierungsstrategien an Kaninchen und Schweinen erprobt. Dabei wurden die Parameter Antigenkonzentration, Aufreinigungsgrad des Testantigens sowie Art und Konzentration der eingesetzten Adjuvantien variiert.

Im ersten Immunisierungsversuch (Versuch Nr. 1) wurde einem Kaninchen wiederholt affinitätschromatografisch aufgereinigtes rHis-StxB2e zusammen mit inkomplettem Freundschens Adjuvans subkutan appliziert. Bereits nach der 2. Immunisierung konnte mit dem rHis-StxB2e-ELISA eine StxB2e-spezifische Serokonversion erfasst werden, wobei die Titer stetig bis zum Tag 98 nach Erstimmunisierung anstiegen. Allerdings waren die induzierten Antikörper nicht in der Lage, die zytotoxische Wirkung von Stx2e gegenüber Verozellen zu neutralisieren. Diese Daten zeigten, dass rHis-StxB2e in dem gewählten System (Tierart,

Antigen, Adjuvans) eine gute Immunogenität aber keine Protektivität aufwies. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen, die man bei der Immunisierung von Kaninchen mit B-Untereinheiten der Shigatoxine vom Typ 1 und Typ 2 gemacht hat (**Bielaszewska et al., 1997; Boyd et al., 1991; Marcato et al., 2001**). Bei jenen Versuchen wurden ähnliche experimentelle Anordnungen (aufgereinigtes StxB1 oder StxB2, subkutane Applikation, inkomplettes Freundsches Adjuvans) gewählt. Nach der Impfung konnte die verozelltoxische Aktivität von Stx1 bzw. Stx2 mit Serumproben dieser Impflinge neutralisiert werden.

In einem weiteren Immunisierungsversuch (Versuch Nr. 2) sollte der Einfluss verschiedener Adjuvantien auf die Bildung spezifischer StxB2e-Antikörper im Kaninchen untersucht werden. Hierzu wurden die Adjuvantien ISA 266, IMS 1313, inkomplettes Freundsches Adjuvans (IFA) bzw. HL-3 zusammen mit dem Zellysat des *E. coli*-Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) als Impfstoff an je zwei Tiere verimpft. Pro Tier wurden jeweils drei Impfungen vorgenommen. Vor, während und nach den Impfphasen wurden Serumproben auf StxB2e-spezifische Antikörper getestet. Es zeigte sich, dass die beiden mit *E. coli*-Zellysat und IFA geimpften Kaninchen nach allen drei Impfungen im Mittel die jeweils höchsten Antikörpertiter aufwiesen, gefolgt von der Testgruppe, die *E. coli*-Zellysat und HL-3 appliziert bekommen hatte. Als Adjuvans war ISA 266 am wenigsten wirksam, da erst nach dreimaliger Applikation eine Serokonversion nachweisbar war. Sowohl bei IFA als auch HL-3 handelt es sich um W/O-("Wasser/Öl"-) Emulsionen, bei denen das Antigen sich in der wässrigen, inneren Phase befindet und verzögert an den Impfling abgegeben wird (**Anonym 2002**). Durch das in den Adjuvantien enthaltene, nicht degradierbare Mineralöl bzw. Isopropoylmyristat wird zudem eine lokale Entzündungsreaktion provoziert, welche zu einer verstärkten Immunantwort führt (**Janeway et al., 2002**). Bei den Adjuvantien IMS 1313 und ISA 266 handelt es sich ebenfalls um W/O-Emulsionen, allerdings ist die hier verwendete ölige Komponente zum Teil abbaubar. Während bei ISA-Adjuvantien als Immunstimulans das Peptid "Survivin" (**Anonym 2006**) zugegeben wird, beinhaltet IMS 1313 sogenannte "GRAS-Substanzen", die aus Nanopartikeln bestehen und immunstimulierend wirken sollen (**Anonym, zitiert nach http://randd.defra.gov/document.aspx?Document=SE2807_983-FRP.pdf**). ISA 266 wird in der Literatur zur Immunisierung von Schafen gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* empfohlen, da eine vergleichbare Immunantwort wie bei Impfstoffen mit IFA erreicht wurde, aber deutlich weniger lokale Entzündungsreaktionen auftraten (**Hazelton, 2003; Reyes et al., 2002**). Diese guten Resultate konnten für die hier untersuchte Indikation (Kaninchen, rekombinantes StxB2e) aber nicht bestätigt werden. Möglicherweise eignet sich ISA 266 als Adjuvans nur für bestimmte Tierarten und/oder bestimmte Impfstofftypen, z.B. bakterielle Ganzzellvakzinen. Auch IMS 1313 wurde bereits bei anderen Tierarten eingesetzt. So berichteten **Quattrocchi et al. (2004)** und **Geuther et al. (2004)** über die Eignung von IMS 1313 zur Induktion einer schnellen humoralen Immunantwort bei Mäusen (Aphthovirus-Impfstoff) bzw. Schweinen (Impfantigen aus Impferreger *Mycoplasma hyopneumoniae*). Wie bereits bei ISA 266 konnte dies in den Versuchen mit rHis-StxB2e für IMS 1313 nicht bestätigt werden. Alle Serumproben aus dem Versuch Nr. 2 wurden zusätzlich auf Stx2e-neutralisierende Antikörper getestet. Dabei konnte leider nur in einer einzigen Serumprobe (nach der 3. Immunisierung mit rHis-StxB2e und HL-3) Stx2e-neutralisierende Aktivität nachgewiesen werden. Aufgrund der erzielten Daten empfiehlt sich zur Immunisierung mit rHis-StxB2e die

Verwendung von HL-3 als Adjuvans. Hier wurden hohe Antikörpertiter erreicht, die zum Teil sogar die zytotoxische Wirkung von Stx2e neutralisierten, und es wurden geringere Nebenwirkungen an der Applikationsstelle erzeugt.

Im Versuch Nr. 3 wurde rHis-StxB2e als Impfantigen bei Ferkeln eingesetzt. Variiert wurden in diesem Immunisierungsversuch das verwendete Adjuvans (ISA 266, HL-3 oder IFA) und der Aufreinigungsgrad von rHis-StxB2e (affinitätschromatografisch aufgereinigtes rHis-StxB2e oder Bakterienzellysate des Stammes BL21(DE3)/pHIT-IV-24). Im Gegensatz zu dem Immunisierungsversuch mit Kaninchen (Versuch Nr. 2) erwies sich ISA 266 bei Ferkeln als bestes Adjuvans. Kein signifikanter Unterschied ließ sich zwischen den Gruppen feststellen, welche aufgereinigtes rHis-StxB2e oder Bakterienzellysate des Stammes BL21(DE3, pHIT-IV-24) erhalten hatten. Somit scheint das Adjuvans den größten Einfluss auf die Induktion von Antikörpern zu haben, wobei sich je nach Tierart ein anderes Adjuvans empfiehlt. Wie in den oben beschriebenen Immunisierungsversuchen mit Kaninchen, wurden auch die Serumproben der Ferkel auf ihr Potential geprüft, die Zytotoxizität von Stx2e zu neutralisieren. Leider konnten in keiner der untersuchten Serumproben Stx2e-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die im ELISA nachgewiesenen StxB2e-spezifischen Serumantikörper offenbar nicht in der Lage sind, die zytotoxische Wirkung des nativen Stx2e zu verhindern, indem sie die Bindung des Toxins an die Verotoxine *in vitro* unterbinden. Immunisierungsversuche, bei denen Stx2e-neutralisierende Antikörper induziert werden konnten, wurden mit Glutaraldehyd-inaktiviertem Holotoxin von Stx2e durchgeführt (**MacLeod and Gyles, 1990; Tscholchiew, 2006; Waddell et al., 1988**). Angaben über die erfolgreiche Induktion Stx2e-neutralisierender Antikörper mit StxB2e als Impfantigen liegen bisher nur von **Tscholchiew (2006)** und von **Ran et al. (2008)** vor. Bei beiden Ansätzen war das StxB2e-Antigen gentechnisch hergestellt und mit zusätzlichen Fusionspartnern versehen worden. So stammte das von Tscholchiew benutzte Impfantigen aus einem *E. coli*-Vektorstamm, der nicht nur das StxB2e, sondern auch das A2-Fragment von Stx2e bildete. Mit diesem Antigen waren 4 - 5 Impfungen notwendig, bis Stx2e-neutralisierende Antikörper in den Serumproben der Kaninchen nachweisbar wurden. **Ran et al. (2008)** stellten ein rekombinantes Fusionsprotein aus der B-Untereinheit des Stx2e und dem hitzelabilen Enterotoxin (Stx2e B-LTB) her. Versuche an Mäusen ergaben, dass die mit StxB2e-LTB immunisierten Tiere nach einer Belastung mit Stx2e in letaler Dosis überlebten. Die Untersuchungen mit StxB2e stehen somit im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur über die Immunogenität der B-Untereinheiten von Stx1 und Stx2. So konnten mit StxB1 und StxB2 sowohl in Mäusen (**Imai et al., 2004; Konadu et al., 1999**) als auch in Kaninchen (**Bielaszewska et al., 1997; Boyd et al., 1991**) und Affen (**Suzaki et al., 2002**) Antikörper induziert werden, welche den jeweils homologen Shigatoxin-Typ *in vitro* zu neutralisieren vermochten. Wie bei den anderen Shigatoxin-Typen ist nach derzeitigem Kenntnisstand auch bei Stx2e die B-Untereinheit für die spezifische Bindung an die Glykolipide Gb3Cer und vor allem Gb4Cer in der Zytoplasmamembran der Zielzellen verantwortlich (**De Grandis et al., 1989; Karmali, 1989; Keusch et al., 1995; Scotland, 1991; Waddell et al., 1988**). Antikörper gegen StxB2e sollten also auch die Bindungsstellen in der B-Untereinheit maskieren und so die zur Zytotoxizität führende Ereigniskaskade an der Zielzelle bereits in der Anheftungsphase unterbrechen. Es kommen mehrere Gründe dafür in Frage, warum es nicht gelang, mit dem

hergestellten rHis-StxB2e bei Impfungen Stx2e-neutralisierende Antikörper zu induzieren. So könnte sich z.B. das rekombinante Produkt rHis-StxB2e in seiner räumlichen Struktur vom natürlichen StxB2e soweit unterscheiden, dass gerade die Bindungsstelle nicht hinreichend genau imitiert wird oder für Antikörper nicht zugänglich ist. Bindungsversuche an Verozellen bzw. Versuche, die Stx2e-Wirkung auf Verozellen mit dem rHis-StxB2e kompetitiv zu hemmen, könnten darüber Aufschluss geben, ob die Rezeptorbindungsstelle im rHis-StxB2e-Molekül funktionsfähig ist. Einen anderen Erklärungsansatz für das Fehlen neutralisierender Antikörper bieten Untersuchungsergebnisse, wonach Stx2e auf Endothelzellen des Schweins auch rezeptorunabhängig zytotoxisch wirkt (**Waddell et al., 1998**). Ob dieser Befund auch auf Verozellen übertragbar ist, bleibt bisher unklar. Prinzipiell auszuschließen ist auch nicht, dass StxB2e aus bisher unbekannten Gründen viel weniger immunogen ist als die B-Untereinheiten von Stx1 und Stx2. Eine geordnete Zusammenlagerung der StxB2e-Moleküle zu Pentameren könnte bei der Ausbildung wichtiger Epitope ebenfalls eine Rolle spielen. Durch die gentechnische Fusion von StxB2e mit Markerpeptiden könnten wichtige Epitope zerstört werden. Die enthaltene Menge an rekombinantem StxB2e-Impfantigen im Impfstoff kann zu gering gewesen sein. Die in dieser Studie erzielten Untersuchungsergebnisse lassen jedenfalls den Schluss zu, dass das rHis-StxB2e gegenwärtig zwar zum Nachweis von Stx2e-spezifischen Antikörpern in Serumproben geeignet ist, beispielsweise im Rahmen der serologischen Labordiagnostik, nicht jedoch als Impfantigen zur Immunisierung von Schweinen gegen die Ödemkrankheit.

Nachweis von StxB2e-Antikörpern bei Zuchtsauen

Die vorliegende Arbeit sollte anhand des Nachweises von StxB2e-spezifischen Antikörpern Aufschluss darüber geben, wie weit die Ödemkrankheit in hessischen Zuchtschweinebeständen verbreitet ist. Hierzu wurden randomisiert entnommene Blutproben von 1.841 Zuchtsauen aus 94 südhessischen Ferkelerzeugerbetrieben auf das Vorkommen von rHis-StxB2e-Antikörpern mittels ELISA untersucht. Bereits in früheren Untersuchungen war an geringeren Tier- und Betriebszahlen gezeigt worden, dass Schweine im Verlauf einer natürlichen Infektion mit EDEC in der Lage sind, StxB2e-spezifische Antikörper zu bilden (**Franke et al., 1995a; Lege, 2003; Wieler et al., 1995**). Mit dem Ziel, mögliche Risikofaktoren für die EDEC-Belastung der Betriebe zu identifizieren, wurden zusätzlich zur Blutprobenentnahme auch tier- und betriebsspezifische Parameter mit einem Fragebogen systematisch erfasst und statistisch auf ihren Zusammenhang mit den serologischen Messwerten ausgewertet.

In 93 der 94 beprobten Betriebe wurden serologisch positive Sauen identifiziert. In dem einzigen Betrieb, an dem keine Sau StxB2e-positiv reagierte, wurden aber immerhin noch 45,5 % der Sauen als serologisch fraglich eingestuft. Insgesamt 979 (53,2 %) aller getesteten Zuchtsauen wiesen somit Stx2e-spezifische Antikörper auf. Nur 12,6 % der Sauen waren serologisch negativ. Da die Stichproben auf randomisierter Basis und auch nach statistischen Kriterien (70 %-ige Prävalenz seropositiver Betriebe; 95 %-ige Sicherheit bei einer angenommenen Prävalenz von 5 % seropositiven Tieren) genommen wurden, können die hier erhobenen Ergebnisse für den südhessischen Raum als repräsentativ angesehen werden. Bereits **Lege (2003)** fand in sechs deutschen Schweinezuchtbetrieben

bei einem überraschend hohen Prozentsatz von 92,0 % der Muttersauen StxB2e-spezifische Antikörper, und zwar unabhängig davon, ob es sich aufgrund des Vorberichtes um Ödemkrankheit-Problembetriebe handelte oder um einen diesbezüglich unverdächtigen Bestand. Die nun im Rahmen dieser Studie mit einer statistisch belastbaren Stichprobenplanung erzielten Resultate bestätigen den von Praktikern vermittelten Eindruck, dass die Ödemkrankheit bzw. der Ödemkrankheit-Erreger in deutschen Schweinezuchtbeständen sehr häufig vorkommt. Die ermittelten Daten legen nahe, dass sich ein hoher Prozentsatz der Zuchtschweine im Laufe ihres Lebens immunologisch aktiv mit dem Erreger auseinandersetzen mussten. Die ermittelte Seroprävalenz erscheint überraschend hoch. Sie korreliert aber recht gut mit den Ergebnissen aus kulturell-bakteriologischen Untersuchungen, in denen man EDEC oder STEC bei immerhin 14 % der gesunden und 15 – 25 % der kranken Ferkel fand, obwohl diese Tiere nur einmalig beprobt worden waren (**Appel et al., 1989; Gannon et al., 1988; Osek et al., 1999**).

Bei der Untersuchung möglicher Einflussfaktoren konnten unter den tierspezifischen Parametern (Alter der Zuchtsauen sowie Serum-IgG-*Toxoplasma gondii*- und *Sarcocystis* sp.-Titer) nur für die Seroprävalenz von *Sarcocystis* sp. ein Zusammenhang statistisch gesichert werden (**Damriyasa, 2001**). Antikörper gegen *Sarcocystis* sp. waren im südhessischen Raum bei 29 % der Sauen zu verzeichnen, wobei *Sarcocystis* sp.-positive Sauen im Mittel einen signifikant niedrigeren StxB2e-Titer als *Sarcocystis* sp.-negative Sauen aufwiesen. Da *Sarcocystis* sp. häufiger bei älteren als bei jüngeren Sauen nachgewiesen wird (**Damriyasa, 2001**), könnte man vermuten, dass der StxB2e-Titer mit dem Alter der Schweine korreliert ist. Dies ließ sich in der Einzelanalyse und Alter (gemessen an der Anzahl der Würfe der Sauen) nicht belegen. Die Ursache für die negative Korrelation von StxB2e und *Sarcocystis* sp. ist bislang nicht geklärt.

Des Weiteren wurden mögliche Zusammenhänge zwischen Anti-StxB2e-Antikörpern und betriebsspezifischen Parametern (geographische Lage, Hygienestatus und Betriebsmanagement) geprüft. Mit dieser Untersuchung sollten vor allem Ansatzpunkte erkannt werden, um EDEC-Infektionen erfolgreich bekämpfen zu können. Daher wurden für diese Untersuchung die mittleren Titer aller Titerwerte der Sauen eines Betriebs errechnet. Bei dem Vergleich der StxB2e-Titer-Mittelwerte zeigte sich, dass Betriebe in westlichen Kreisen (Limburg-Weilburg-Oberland und Rheingau-Taunus-Limburg-Weilburg) im Mittel signifikant niedrigere StxB2e-Titer als Betriebe im östlichen Südhessen (Main-Kinzig, Darmstadt-Dieburg-Offenbach und Odenwald) aufwiesen. Hierfür könnten regional unterschiedliche Präferenzen für bestimmte Betriebsarten ursächlich sein. Dies wurde direkt bzw. indirekt im Fragebogen erfasst (Herkunft der Sauen bzw. Betriebsart). Es konnten dabei aber keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. Daten zur Verbringung von Schweinen innerhalb eines geographischen Bereiches waren nicht erhältlich, so dass derartige Zusammenhänge leider nicht analysiert werden konnten. Von allen aufgeführten Parametern erwiesen sich nur zwei bezüglich der StxB2e-Antikörperproduktion als relevant. So konnte ein Zusammenhang zwischen der Bodenbeschaffenheit im Wartestall und dem innerbetrieblichen mittleren StxB2e-Titer belegt werden. Dabei wurden bei Sauen, die auf Spaltenboden gehalten wurden, signifikant höhere Antikörpertiter detektiert als bei Tieren mit Haltung auf Einstreu, gemischtem Bodenbelag und Boden ohne Einstreu. Die drei

letztenannten Bodenbeläge hatten bei nur geringfügigen Abweichungen untereinander keinen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf den mittleren StxB2e-Titer. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die hygienische Beschaffenheit des Wartestalls die Zirkulation und Persistenz von EDEC-Bakterien im Bestand stark beeinflusst. Sauen auf Spaltenböden haben häufiger Kontakt zu EDEC-kontaminierten Fäkalien als auf anderen Bodenbelägen. Dies ist sicherlich nicht allein auf die bauliche Beschaffenheit des Bodens zurückzuführen, sondern muss im Zusammenhang mit den Gepflogenheiten der Reinigung und Desinfektion dieses Bodentyps evaluiert werden. Eigentlich sollen Spaltenböden bei geringem arbeitstechnischen Aufwand verhindern, dass die Tiere mit größeren Mengen an Fäkalien in Kontakt kommen. Aber vielleicht führt gerade diese Erwartungshaltung dazu, dass Spaltenböden seltener und weniger intensiv gereinigt und desinfiziert werden als beispielsweise Böden ohne Einstreu, die vordergründig als hygienisch bedenklicher einzustufen sind. Ein anderer Erklärungsansatz für die Korrelation zwischen Spaltenboden im Wartestall und hohen Anti-StxB2e-Titern wäre, dass das Stallklima in den Warteställen mit Spaltenböden für die trächtigen Sauen belastender ist und dies die Entstehung von infektiösen Erkrankungen und somit auch direkt oder indirekt EDEC-Infektionen begünstigt (**Rokicki, 1973; Waldmann und Wendt, 2001**). Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass in der vorliegenden Studie nur neun Betriebe (9,6 %) Spaltenböden in ihrem Wartebereich für Sauen einsetzten. Die Beobachtung, dass die Anti-StxB2e-Titer in solchen Betrieben höher sind, sollte daher an einer größeren Anzahl von Betrieben gezielter auf seine Ursachen untersucht werden. Als ein weiterer Risikofaktor für hohe StxB2e-Titer konnte der Befall der Zuchtsauen mit Läusen (*Haematopinus suis*) festgestellt werden. So zeigten Betriebe, in denen während der 5 vorangegangenen Jahre Lausbefall konstatiert worden war, signifikant höhere StxB2e-Titer als Betriebe, in denen keine Läuse nachgewiesen worden waren. Hierbei ist anzumerken, dass insgesamt nur wenige Zuchtsauen dieser Studie (2,5 %) aber 27,7 % der Betriebe einen *Haematopinus*-Befall aufwiesen (**Damriyasa, 2001**). Als Risikofaktoren für Lausbefall wurden in den Betrieben die ausschließlich mechanische Stallreinigung (im Gegensatz zu Reinigung mit zusätzlicher Desinfektion) und der Weidegang statistisch gesichert (**Damriyasa et al., 2004**). Dies könnten auch Faktoren sein, welche zu einer vermehrten Auseinandersetzung der Schweine mit EDEC führen, die aber in der isolierten Analyse nicht erkannt werden konnten.

Management-Parameter, die einen Einfluss auf den StxB2e-Titer haben könnten, wurden in der vorliegenden Studie ebenfalls untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur das Absetzalter der Ferkel von der Muttersau einen signifikanten Risikofaktor für einen erhöhten StxB2e-Titer im Betrieb darstellte. In Betrieben, in denen die Ferkel im Durchschnitt länger bei der Muttersau verblieben, waren die Antikörpertiter im Mittel niedriger als in Betrieben mit früheren Absetzterminen. Offenbar müssen sich Sauen in Betrieben mit späteren Absetzterminen seltener mit EDEC auseinandersetzen als in Betrieben, in denen früher abgesetzt wird. Vermutlich ist der EDEC-spezifische Infektionsdruck, der insbesondere von EDEC-infizierten Absetzferkeln ausgeht, geringer, wenn die Säugeperiode länger dauert. Um den Absetzzeitpunkt entsteht bei Ferkeln die sogenannte immunologische Lücke, in der die maternale Immunität verschwindet, da die über das Kolostrum erworbenen Immunglobuline physiologischerweise abgebaut werden, und die eigene, aktiv aufgebaute Immunität noch nicht belastbar ist (**Bourne, 1976; Porter, 1986; Tizard, 2004**). Die negative Korrelation

zwischen der Höhe des betrieblichen StxB2e-Titers bei Sauen und dem Absetzalter könnte deshalb darin begründet sein, dass die Ferkel aufgrund dieser Lücke und aufgrund ihrer schlechteren Konstitution zu den frühen Absetzterminen noch nicht so gut in der Lage sind wie später, die intestinale Infektion mit EDEC-Bakterien zu kontrollieren bzw. sogar abzuwehren. Wahrscheinlich helfen in der Milch enthaltene, gegen EDEC gerichtete Immunglobuline den Ferkeln, die kritische Phase der immunologischen Lücke zwischen der 3. und 5. Lebenswoche zu überstehen.

Die mit Hilfe der mehrfaktoriellen Kovarianzanalyse erfasste signifikante Beziehung zwischen dem betrieblichen StxB2e-Antikörpertiter und dem durchschnittlichen Absetzalter der Ferkel, dem Lausbefund der letzten 5 Jahre sowie dem geographischen Standort des Betriebs bestätigte die in den Einzelanalysen gefundenen Befunde. Es konnten keine weiteren Covariablen mit einem signifikanten Einfluss auf den mittleren StxB2e-Titer identifiziert werden. Als stärkster Risikofaktor für eine regelmäßige Auseinandersetzung der adulten Schweine mit EDEC, gemessen am mittleren StxB2e-Titer eines Betriebes, wurde das durchschnittliche Absetzalter der Ferkel identifiziert, der aber auch durch den Lausbefund und die geographische Lage des Betriebes beeinflusst wird. Für Ödemkrankheit-Problembetriebe kann deshalb empfohlen werden, den Absetzzeitpunkt der Ferkel von der Muttersau auf die 5. bis 6. Lebenswoche zu verschieben.

Um zu prüfen, ob bei der natürlichen Immunantwort gegen EDEC auch Stx2e-neutralisierende Antikörper induziert werden, wurden 200 ausgewählte Plasmaproben der 1.841 untersuchten südhessischen Zuchtsauen im Stx2e-Neutralisationstest untersucht. Dabei sollte auch erfasst werden, ob anhand des im ELISA gemessenen StxB2e-Titers ein Rückschluss auf die Menge an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern in der untersuchten Plasmaprobe gezogen werden kann. Nur mit einer einzigen, im ELISA hochtitrigen Plasmaprobe, konnte die zytotoxische Aktivität von Stx2e *in vitro* zum Teil aufgehoben werden. Dieser Befund ist in Anbetracht der Häufigkeit, mit der sich StxB2e-bindende Antikörper mit dem ELISA aufspüren ließen, sehr überraschend. Das Ergebnis stimmt allerdings auch mit den publizierten Beobachtungen von **Gannon et al. (1988)** überein. Diese Arbeitsgruppe untersuchte Serumproben von 45 Ferkeln, von denen einige sogar EDEC fäkal ausschieden, konnte aber bei keinem Ferkel Stx2e-neutralisierende Antikörper im Serum nachweisen. Das Fehlen nahezu jeglicher Stx2e-neutralisierender Aktivität ist außerdem auch mit den Ergebnissen aus den Immunisierungsversuchen der vorliegenden Untersuchung konsistent. Ganz offensichtlich bedeuten hohe Antikörpertiter gegen die B-Untereinheit von Stx2e nicht, dass dadurch das Stx2e in seiner verotoxischen Aktivität neutralisiert wird. Als mögliche Ursachen kommen in Betracht:

Der rHisStxB2e-ELISA misst Antikörper gegen irgendein kreuzreagierendes Antigen, z.B. Antikörper gegen den 6-His-Tag.

Der Stx2e-Neutralisationstest ist zu wenig sensitiv, um die wenigen neutralisierenden Antikörper zu erfassen.

Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit festgestellte hohe Seroprävalenz lässt folgende Schlussfolgerungen zu:

1. EDEC treten in deutschen Schweinezuchtbeständen häufig auf und sind sehr weit verbreitet.
2. Einige der identifizierten Risikofaktoren (frühes Absetzen der Ferkel, Nachweis von *Haematopinus suis* in den letzten fünf Jahren und Spaltenboden im Wartebereich der Sauen sowie die Lokalisation der Betriebe im westlichen Bereich Südhessens) könnten für Problembetriebe Ansatzpunkte für Sanierungsmaßnahmen bieten.
3. Bei den derzeit in Deutschland zirkulierenden EDEC-Isolaten scheint es sich um einen sehr heterogenen Pool von Erregern zu handeln, da neben Stx2e kein weiterer Virulenzfaktor identifiziert werden konnte, der bei allen Erregern vorhanden war. Daher kann ausschließlich das Stx2e als mögliches Zielantigen für Diagnostika oder Vakzine angesehen werden.
4. Die rekombinant hergestellte B-Untereinheit von Stx2e (rHis-StxB2e) konnte als Impfantigen bei Kaninchen und Ferkeln StxB2e-spezifische Antikörper induzieren. Allerdings waren die gebildeten Antikörper nicht in der Lage, Stx2e *in vitro* zu neutralisieren. Mit Hilfe des rHis-StxB2e-ELISA war es möglich, eine große Anzahl von Schweinen auf StxB2e-spezifische Antikörper zu untersuchen. Da im Rahmen einer natürlichen Infektion mit EDEC anscheinend nur sehr geringe Mengen an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern gebildet werden, bietet der rHis-StxB2e-ELISA bei der Erfassung der Seroprävalenz gegenüber dem Stx2e-Neutralisationstest erhebliche Vorteile.
5. Zukünftige Untersuchungen sollten sich insbesondere mit der Entwicklung einer inaktivierten Stx2e-Vakzine auf Basis des Stx2e-Holotoxins beschäftigen, da die B-Untereinheit des Stx2e alleine, kein hinreichend protektives Impfantigen zu sein scheint.
6. Daneben sollten eine routinemäßige Kontrolle der Schweine auf Ektoparasiten erfolgen und gegebenenfalls entsprechende Behandlungen durchgeführt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ödemkrankheit (*syn.* Colienterotoxämie) ist eine weltweit vorkommende, wirtschaftlich verlustreiche Infektionskrankheit der Schweine, von der bevorzugt Ferkel während der ersten beiden Wochen nach dem Absetzen von der Mutter betroffen sind. Erreger der Erkrankung sind die sog. "edema disease" *Escherichia coli* (EDEC). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten derzeit in Deutschland zirkulierende EDEC-Stämme auf gemeinsame Virulenzfaktoren untersucht werden, die als mögliche Antigene für Diagnostika bzw. Vakzine eingesetzt werden könnten. Ferner sollte die EDEC-Seroprävalenz in hessischen Zuchtsauenbeständen bestimmt werden.

E. coli-Isolate (n = 1.428) aus den Kotproben erkrankter Schweine wurden mit kulturell-bakteriologischen und molekularbiologischen Methoden auf das Vorhandensein der Gene für Stx2e, Fimbrien (F4, F5, F6, F18 und F41), Intimin, *E. coli*-Enterotoxine, α -Hämolysin und O-Antigene untersucht. 164 (11,5 %) Isolate wurden als STEC identifiziert, wobei alle Isolate Stx2e kodierten, das für die Ödemkrankheit verantwortlich ist. Von diesen Isolaten besaßen insgesamt 89 (54,3 %) Isolate auch ein (2,4 %), zwei (46,3 %) oder drei (5,5 %) *E. coli*-Enterotoxingene. Am häufigsten wurde das hitzestabile *E. coli*-Enterotoxin ST-II (52,4 %) nachgewiesen. 146 (89,0 %) STEC-Stämme waren *fedA* (F18-Fimbrien) positiv. Kein Isolat besaß eines der anderen untersuchten Fimbriengene (F4, F5, F6 und F41) oder das *eae*-Gen. Unter Verwendung von acht polyvalenten Testseren konnte bei 139 STEC-Isolaten (85 %) der O-Typ bestimmt werden. Hier traten vor allem die O-Antigene O141 (51,2 %), O139 (19,5 %) und O138 (7,9 %) auf. *E. coli*-Stämme der O-Gruppen O147 (4,3 %), O149 (1,2 %) und O157 (0,6 %) kamen seltener vor. α -Hämolysin auf Schafblut-Agar zeigten 153 (93,3 %) STEC-Isolate. Insgesamt 124 (75,6 %) STEC-Isolate konnten anhand der Schlüsselmerkmale *stx2e* und *fedA* als typische EDEC-Stämme identifiziert werden.

Um EDEC-spezifische Antikörper bei Schweinen messen zu können, wurde ein ELISA (rHis-StxB2e-ELISA) etabliert, in dem die B-Untereinheit von Stx2e als stationäres Fangantigen eingesetzt wurde. Das Antigen wurde auf gentechnischem Wege als rekombinantes, Histidin-markiertes Fusionsprotein hergestellt und affinitätschromatografisch aufgereinigt. In drei verschiedenen Immunisierungsmodellen wurde rHis-StxB2e auch als Impfantigen an Kaninchen (n = 11) und Ferkeln (n = 30) eingesetzt, um es auf seine Immunogenität zu prüfen. In den Versuchen wurden die Parameter Antigenkonzentration und Aufreinigungsgrad sowie Adjuvans (ISA 266, IMS 1313, inkomplettes Freundsches Adjuvans und HL-3) variiert. Jeder Impfling reagierte auf die Verimpfung von rHis-StxB2e mit der Bildung von Immunglobulinen, was sich im rHis-StxB2e-ELISA als hochsignifikante Serokonversion manifestierte. Mit der einzigen Ausnahme eines Kaninchens, waren Stx2e-neutralisierende Antikörper in den Immunseren jedoch nicht nachweisbar.

Zur Bestimmung der Seroprävalenz wurden 94 Schweinezuchtbetriebe in Hessen durch Randomisierung zur Beprobung ausgewählt. Die Anzahl der je Betrieb zu beprobenden Sauen richtete sich nach der Herdengröße. Dabei sollte bei einer angenommenen innerbetrieblichen Seroprävalenz von 5 % mit 95 %-iger Sicherheit wenigstens ein positives Tier erfasst werden. Insgesamt wurden Blutproben von 1.841 Zuchtsauen mit dem rHis-StxB2e-ELISA auf Stx2e-spezifische Antikörper untersucht. Seropositive Zuchtsauen

konnten in 93 Betrieben ermittelt werden. In 87,2 % der Betriebe reagierten mindestens 25 % der Zuchtsauen seropositiv, in 53,2 % mindestens 50 % und in 22,3 % sogar mehr als 75 % der Zuchtsauen. Die statistische Prüfung betrieblicher Einflussfaktoren auf die Seroprävalenz ergab, dass der Anteil seropositiver Sauen in Betrieben, die Einstreu im Wartestall verwendeten, geringer war als in Betrieben ohne Einstreu ($p < 0,05$). Ferner war die Seroprävalenz in Betrieben der drei südwestlich gelegenen Landkreise im Mittel signifikant höher als in den Betrieben der nordöstlichen Kreise der Untersuchungsregion ($p < 0,05$). Das Absetzalter der Ferkel war negativ mit dem innerbetrieblichen StxB2e-Titer korreliert ($p < 0,05$). Andere Faktoren wie die Betriebsart (geschlossener *versus* offener Betrieb), die Herkunft der Sauen (eigene Nachzucht *versus* Zukauf), die Verwendung von Einstreu im Abferkelstall, die Reinigungsintensität oder die durchschnittliche Anzahl der Geburten pro Sau und Jahr hatten keinen statistisch nachweisbaren Einfluss.

Nach diesen Ergebnissen sind EDEC in deutschen Schweinezuchtbeständen sehr weit verbreitet. Neben dem Hauptvirulenzfaktor Stx2e gibt es keinen Marker, den alle EDEC besitzen und der sich als weiteres stammübergreifendes Zielantigen für Diagnostika bzw. Therapeutika anbieten würde. Das rHis-StxB2e-Molekül erwies sich in Immunisierungsversuchen als immunogen aber nicht protektiv und war als Fangantigen im ELISA sehr gut zur Diagnostik geeignet. Die mit dem rHis-StxB2e-ELISA erfasste EDEC-Seroprävalenz in südhessischen Schweinezuchtbetrieben zeigte, dass innerhalb der Betriebe deutliche Unterschiede im Anteil seropositiver Sauen vorlagen. Die Abschaffung der identifizierten Risikofaktoren (geringes Absetzalter der Ferkel, Lausbefall und Bodenbeschaffenheit) könnte Landwirte bei der Bekämpfung der Ödemkrankheit unterstützen.

6 SUMMARY

Edema disease is an infectious disease of pigs that causes significant economic losses in breeding farms worldwide. Piglets during the first two weeks after weaning are most vulnerable for this disease. Certain *Escherichia coli* strains, designated as "edema disease *Escherichia coli*" (EDEC), represent the etiological agent of edema disease which is also termed *E. coli* enterotoxaemia. The aim of the present study was to investigate circulating EDEC strains in Germany for common virulence factors that could be used as possible antigens for diagnostics and/or vaccines. Furthermore, the seroprevalence of EDEC in pig breeding farms in Hesse (Germany) should be determined.

Fecal *Escherichia coli* isolates (n = 1.428) from piglets with edema disease were screened by cultural bacteriological and molecular biological methods for the genes of Stx2e, adhesive fimbriae (F4, F5, F6, F18 and F41), intimin, *E. coli* enterotoxins, α -hemolysin and O antigens. A total of 164 (11.5 %) isolates were identified as shigatoxin-encoding *E. coli* (STEC), whereby all these isolates encoded for the Stx2e type of shigatoxins which is responsible for the edema disease of pigs. From these isolates, 89 (54.3 %) isolates tested positive for one, (2.4 %), two (46.3 %) or three (5.5 %) enterotoxin genes. The heat-stable *E. coli* enterotoxin ST-II (52.4 %) was most frequently detected. 146 (89.0 %) STEC isolates proved positive for *fedA* (F18-fimbria) while no STEC isolate harbored a gene for any other tested fimbriae (F4, F5, F6 and F41) or the *eae* gene. Using eight polyvalent test sera the O-type could be determined in 139 STEC isolates (85 %). Here, O-antigens O141 (51.2 %), O139 (19.5 %) and O138 (7.9 %) occurred most often while *E. coli* isolates with O-antigens O147 (4.3 %), O149 (1.2 %) and O157 (0.6 %) were less frequent. The majority of STEC isolates (n = 153; 93.3 %) showed an α -hemolysin phenotype on sheep blood agar. On the basis of the key features *stx2e* and *fedA* a total of 124 (75.6 %) STEC isolates could be classified as typical EDEC strains.

In order to quantify EDEC specific antibodies in pigs an ELISA (rHis-StxB2e-ELISA) was established. In this assay the B-subunit of Stx2e was used as immobilized test antigen. The antigen was produced as recombinant histidine-tagged fusion protein by genetic engineering and purified from bacterial cultures by affinity chromatography. To test its immunogenicity, the rHis-StxB2e was inoculated into rabbits (n = 11) and piglets (n = 30) in three different models of immunization. In these assays, several parameters were varied, in particular antigen concentration and purification grade as well as adjuvants (ISA 266, IMS 1313, incomplete Freund's adjuvant and HL-3). Each treated animal reacted to the inoculation of rHis-StxB2e by the production of antibodies which manifested itself as highly significant seroconversion in the rHis-StxB2e-ELISA. With the exception of one rabbit, Stx2e-neutralizing antibodies were not detected in the immune sera of any animal.

To determine the seroprevalence, 94 pig-breeding farms in Hesse were randomly selected for sampling. The number of sows to be tested on each farm depended on the herd size. At an anticipated in-plant seroprevalence of 5 % at least one animal should test positive with 95 % reliability among the animals tested. Thus, a total of 1.841 breeding sows were tested for Stx2e-specific antibodies with the rHis-StxB2e-ELISA. Seropositive breeding sows could be determined in 93 farms. In 87.2 % of the farms at least 25 % the breeding sows reacted

seropositive, in 53.2 % at least 50 % and in 22.3 % even more than 75 %. Statistic analysis of operational factors for their putative effect on the in-plant seroprevalence revealed that the earlier piglets were weaned the higher was the mean anti-rHis-StxB2e titer in a farm ($p = 0.013$). Furthermore, the portion of seropositive sows was lower in farms where straw bedding was used in the dry sow house than in farms with strawless bedding ($p < 0.05$). Additionally, the seroprevalence was significantly higher in farms of the three south-western districts than in farms of the north-eastern districts of the investigation region ($p < 0.05$). Other factors like farm type (closed vs. open farms), origin of sows (own offspring vs. additional purchase), use of straw bedding in the farrowing house, cleaning regime as well as average number of births per sow and year had no measurable influence.

According to these results, EDEC is far common in German pig breeding stocks. Beside the major virulence factor Stx2e there is no other marker that is present in all EDEC strains and therefore may be suitable as an EDEC specific target antigen for diagnostics and/or therapeutics. The rHis-StxB2e antigen is immunogenic and highly valuable as a test antigen in the ELISA. However, this antigen does not provoke the production of Stx2e-neutralizing antibodies. The EDEC serum prevalence in pig breeding farms in southern Hesse shows significant differences between the farms as seized with the rHis-StxB2e-ELISA. The abolishment of the identified risk factors (weaning age of the piglets, lice infestations and floor conditions) could support farmers in their efforts to prevent and control porcine edema disease.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aarestrup, F. M., S. E. Jorsal, P. Ahrens, N. E. Jensen and A. Meyling.** 1997. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. J. Clin. Microbiol. 35: 20-24.
- Alexa, P., E. Salajka, J. Hamřík and M. Zizlavsky.** 1998. Oedema disease of swine: Formation of antibodies neutralizing Shiga-like toxin IIv in piglets immunized with the toxoid SLTII. Vet. Med. - Czech. 43: 11-16.
- Alexa, P., J. Hamřík, E. Salajka, K. Štrouracová and I. Rychlík.** 2000. Differentiation of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from piglets and calves in the Czech Republic. Vet. Med. - Czech. 45: 39-43.
- Author.** 2002. W/O Emulsion Adjuvanszusammensetzung für Impfstoffe. WO/2002/013856. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2002013856>.
- Author.** 2006. Survivin peptide vaccine. WO/2006/081826. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2006%2F081826>.
- Anonym.** 2003a. Kits for *E. coli* Serotyping (*E. coli* antisera): Determination of O Antigen. <http://www.lugo.usc.es/ecoli/>. Letzter Zugriff am 14. November 2006
- Anonym.** 2003b. The QIAexpressionist™ - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5th ed. Vol. 06: QIAgen GmbH, Hilden.
- Anonym.** 2006. Diagnostic *E. coli* Antisera. <http://www.ssi.dk/sw1297.asp>. Letzter Zugriff am 14. November 2006
- Appel, G., C. Ewald, A. Heer, G. von Mickwitz, S. Aleksic, H. Rüssmann, T. Meyer and H. Karch.** 1989. Vorkommen und Bedeutung von Verotoxin-(Shiga-like-Toxin) produzierenden *Escherichia-Coli*-Stämmen beim Schwein. Tierärztl. Umsch. 44: 410-420.
- Appel, G., C. Ewald, A. Heer, G. von Mickwitz, S. Aleksic, H. Rüssmann, T. Meyer and H. Karch.** 1990. Morphologische Veränderungen am Darm von Schweinen nach Infektion mit verotoxinbildenden *Escherichia coli*. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 97: 357-360.
- Awad-Masalmeh, M., M. Schuh, J. Kofer and E. Quakyi.** 1989. Überprüfung der Schutzwirkung eines Toxoidimpfstoffes gegen die Ödemkrankheit des Absetzferkels im Infektionsmodell. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 96: 419-421.
- Baljer, G. and L. H. Wieler.** 1998. Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)-Aktuelle Informationen zu einem neuen, medizinisch bedeutsamen Zoonoserreger. Lohmann Information (4).
- Baljer, G. and S. Franke.** 1999. Antikörperantwort und Ausscheidungskinetik bei Schweinen mit Ödemkrankheit. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 106: 405.
- Barth, S.** 2003. Untersuchung zur immunologischen Bedeutung des Virulenzfaktors SpvD von *Salmonella enterica*. Vet. Med. Diss. aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Barth, S., Tscholshiew A., Menge C., Weiss R., Baljer G. and Bauerfeind R.** 2007. Virulence and fitness gene patterns of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from pigs with edema disease or diarrhea in Germany. Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr. Jul-Aug;120(7-8):307-16.
- Bauer, M. E. and R. A. Welch.** 1996. Association of RTX toxins with erythrocytes. Infect. Immun. 64: 4665-4672.

- Bauerfeind, R.** 1999. Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des Lipopolysaccharids bei der Immunabwehr und beim Nachweis von *Salmonella enterica*-Infektionen. Habilitationsschrift aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Bertschinger, H., M. Munz-Müller, H. P. Pfrifter and A. Schneider.** 1986. Vererbte Resistenz gegen Colienterotoxämie beim Schwein. J. Anim. Breed. Genet. 103: 255-264.
- Bertschinger, H. and C. Gyles.** 1994. Oedema disease of pigs. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wollingford, Guildford: Verlag CAB-International, Oxfordshire U.K.
- Bertschinger, H. U., H. Jucker, H. P. Pfrifter and J. Pohlenz.** 1983. Role of nutrition in the pathogenesis of porcine *Escherichia coli* enterotoxaemia. Ann. Rech. Vet. 14: 469-472.
- Bertschinger, H. U. and J. Pohlenz.** 1983. Bacterial colonization and morphology of the intestine in porcine *Escherichia coli* enterotoxemia (edema disease). Vet. Pathol. 20: 99-110.
- Bertschinger, H. U., M. Bachmann, C. Mettler, A. Pospischil, E. M. Schraner, M. Stamm, T. Sydler and P. Wild.** 1990. Adhesive fimbriae produced *in vivo* by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs. Vet. Microbiol. 25: 267-281.
- Bertschinger, H. U., M. Stamm and P. Vögeli.** 1993. Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. Vet. Microbiol. 35: 79-89.
- Bettelheim, K. A.** 2003. The Serotypes of Vero Toxin-Producing *Escherichia coli* reported in the Literature, apart from those belonging to Serogroup O157. <http://www.sciencenet.com.au/vtetable.htm>. Letzter Zugriff am 14. November 2006
- Beutin, L. and M. A. Montenegro.** 1990. Enterohaemolysin and shiga-like toxin genes in *E. coli*. Vet. Rec. 127: 316.
- Beutin, L., D. Geier, H. Steinrück, S. Zimmermann and F. Scheutz.** 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J. Clin. Microbiol. 31: 2483-2488.
- Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss and K. Gleier.** 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. J. Clin. Microbiol. 42: 1099-1108.
- Bhakdi, S., N. Mackman, G. Menestrina, L. Gray, F. Hugo, W. Seeger and I. B. Holland.** 1988. The hemolysin of *Escherichia coli*. Eur. J. Epidemiol. 4: 135-143.
- Bhakdi, S., H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, M. Kehoe and M. Palmer.** 1996. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. Arch. Microbiol. 165: 73-79.
- Bielaszewska, M., I. Clarke, M. A. Karmali and M. Petric.** 1997. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. Infect. Immun. 65: 2509-2516.
- Bilkei, G.** 1979. Bericht über die Prophylaxe der Ödemkrankheit mit Medizinalfutter unter Praxisbedingungen. Wien. Tierarztl. Monatsschr. 66: 256 - 259.
- Bilkei, G.** 1989. Beiträge zur Therapie der Ödemkrankheit des Schweines. Acta Vet Hung 44: 237 - 240.

- Bilkei, G. und A. Bölcskei.** 1995. Metaphylaxe der Ödemkrankheit/Kolikomplex der abgesetzten Ferkel mit Acepromazin und Tripelenamin. *Der Praktische Tierarzt* 4: 317-321.
- Bischoff, C., J. Luthy, M. Altwegg and F. Baggi.** 2005. Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 61: 335-341.
- Blanco, J., E. A. González, I. Bernárdez and B. Regueiro.** 1983. Differentiated biological activity of verocytotoxins (VT) released by human and porcine *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 20: 167-170.
- Blanco, J., E. A. Gonzalez, I. Bernardez and B. R. Varela.** 1983. Enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* in Galicia (north-west Spain). *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)*. 172: 165-169.
- Blanco, M., L. Lazo, J. E. Blanco, G. Dahbi, A. Mora, C. López, E. A. González and J. Blanco.** 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *Int Microbiol* 9: 53-60.
- Boodhoo, A., R. J. Read and J. Brunton.** 1991. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of verotoxin-1 B-subunit. *J. Mol. Biol.* 221: 729-731.
- Boss, P., R. P. Monckton, J. Nicolet and A. P. Burnens.** 1992. Nachweis von Toxingenen verschiedener *E. coli* Pathotypen beim Schwein mit nichtradioaktiv markierten Sonden. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 134: 31-37.
- Bosworth, B. and T. Casey.** 2009. Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: 25-30.
- Bosworth, B. T., J. E. Samuel, H. W. Moon, A. D. O'Brien, V. M. Gordon and S. C. Whipp.** 1996. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect. Immun.* 64: 55-60.
- Bosworth, B. T., E. A. Dean-Nystrom, T. A. Casey and H. L. Neibergs.** 1998. Differentiation of F18ab+ from F18ac+ *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis of the major fimbrial subunit gene (*fedA*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 299-302.
- Bourne, F. J.** 1976. Humoral immunity in the pig. *Vet. Rec.* 98: 499-501.
- Boyd, B., S. Richardson and J. Gariepy.** 1991. Serological responses to the B subunit of Shiga-like toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B subunit is a vaccine candidate to counter action of the toxin. *Infect. Immun.* 59: 750-757.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, J. E., D. E. Griffin, S. W. Rothman and B. P. Doctor.** 1982. Purification and biological characterization of shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1. *Infect. Immun.* 36: 996-1005.
- Bülte, M., M. A. Montenegro, R. Helmuth, T. Trumpf and G. Reuter.** 1990. [Detection of verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in healthy cattle and swine with the DNA-DNA colony hybridization method]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 103: 380-384.
- Bürk, C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bülte and E. Martlbauer.** 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2106-2112.

- Burnette, W. N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- Calderwood, S. B., F. Auclair, A. Donohue-Rolfe, G. T. Keusch and J. J. Mekalanos.** 1987. Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 4364-4368.
- Calderwood, S. B., D. W. Acheson, G. T. Keusch, J. T. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr and I. K. Wachsmuth.** 1996. Proposed New Nomenclature for SLT (VT) Family. *ASM News* 62: 118-119.
- Caprioli, A., A. Nigrelli, R. Gatti, M. Zavarella, A. M. Blando, F. Minelli and G. Donelli.** 1993. Characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet. Rec.* 133: 323-324.
- Chapman, P. A., C. A. Siddons, A. T. Malo and M. A. Harkin.** 1996. Lamb products as a potential source of *E. coli* O157. *Vet. Rec.* 139: 427-428.
- Clugston, R. E. and N. O. Nielsen.** 1974. Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). I. Detection and preparation of an active principle. *Can. J. Comp. Med.* 38: 22-28.
- Clugston, R. E., N. O. Nielsen and W. E. Roe.** 1974a. Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). II. The development of hypertension after the intravenous administration of edema disease principle. *Can. J. Comp. Med.* 38: 29-33.
- Clugston, R. E., N. O. Nielsen and D. L. Smith.** 1974b. Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). 3. Pathology and pathogenesis. *Can. J. Comp. Med.* 38: 34-43.
- Čobeljić, M., B. Dimić, D. Opačić, Z. Lepšanić, V. Stojanović and S. Lazić.** 2005. The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia. *Epidemiol. Infect.* 133: 359-366.
- da Silva, A. S., G. F. Valadares, M. P. Penatti, B. G. Brito and D. da Silva Leite.** 2001. *Escherichia coli* strains from edema disease: O serogroups, and genes for Shiga toxin, enterotoxins, and F18 fimbriae. *Vet. Microbiol.* 80: 227-233.
- Damriyasa, I. M.** 2001. Querschnittsstudie zu Parasitosen bei Zuchtsauen in südhessischen Betrieben. *Vet. Med. Diss. aus dem Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.*
- Damriyasa, I. M., C. Bauer, R. Edelhofer, K. Failing, P. Lind, E. Petersen, G. Schares, A. M. Tenter, R. Volmer and H. Zahner.** 2004. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Vet. Parasitol.* 126: 271-286.
- Damriyasa, I. M., K. Failing, R. Volmer, H. Zahner and C. Bauer.** 2004. Prevalence, risk factors and economic importance of infestations with *Sarcoptes scabiei* and *Haematopinus suis* in sows of pig breeding farms in Hesse, Germany. *Med. Vet. Entomol.* 18: 361-367.
- De Cupere, F., P. Deprez, D. Demeulenaere and E. Muylle.** 1992. Evaluation of the effect of 3 probiotics on experimental *Escherichia coli* enterotoxaemia in weaned piglets. *Zentralbl. Bakteriol. [Orig B]* 39: 277-284.
- De Grandis, S., H. Law, J. Brunton, C. Gyles and C. A. Lingwood.** 1989. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J. Biol. Chem.* 264: 12520-12525.

- De Rycke, J., A. Milon and E. Oswald.** 1999. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet. Res.* 30: 221-233.
- Dean-Nystrom, E. A., T. A. Casey, R. A. Schneider and B. Nagy.** 1993. A monoclonal antibody identifies 2134P fimbriae as adhesins on enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs. *Vet. Microbiol.* 37: 101-114.
- Deprez, P., Van den Hende, C., Muylle, E. and Oyaert, W.** 1986. The influence of the administration of sow's milk on the post-weaning excretion of hemolytic *E. coli* in the pig. *Vet Res. Commun.* 10: 469-478.
- Dobrescu, L.** 1983. New biological effect of edema disease principle (*Escherichia coli*-neurotoxin) and its use as an in vitro for this toxin. *Am. J. Vet. Res.* 44: 31-34.
- Docic, M. and G. Bilkei.** 2003. Vaccination of weaned pigs against oedema disease. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 110: 466-468.
- Donohue-Rolfe, A., M. Jacewicz and G. T. Keusch.** 1989. Isolation and characterization of functional Shiga toxin subunits and renatured holotoxin. *Mol. Microbiol.* 3: 1231-1236.
- Downes, F. P., T. J. Barrett, J. H. Green, C. H. Aloisio, J. S. Spika, N. A. Strockbine and I. K. Wachsmuth.** 1988. Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56: 1926-1933.
- Eslava, C., F. Navarro-Garcia, J. R. Czeizulin, I. R. Henderson, A. Cravioto and J. P. Nataro.** 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 66: 3155-3163.
- Esser, C.** 1999. Untersuchungen zu Zusammenhängen zwischen der Resistenz gegenüber enterotoxämischen *Escherichia coli* (F18) und der Mastleistung sowie der Schlachtkörperqualität beim Schwein. *Vet. Med. Diss. aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig-Universität Gießen.*
- Fekete, P. Z., G. Schneider, F. Olasz, G. Blum-Oehler, J. H. Hacker and B. Nagy.** 2003. Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 287-298.
- Franke, S., F. Gunzer, L. H. Wieler, G. Baljer and H. Karch.** 1995a. Construction of recombinant Shiga-like toxin-IIv (SLT-IIv) and its use in monitoring the SLT-IIv antibody status of pigs. *Vet. Microbiol.* 43: 41-52.
- Franke, S., D. Harmsen, A. Caprioli, D. Piérard, L. H. Wieler and H. Karch.** 1995b. Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3174-3178.
- Fratamico, P. M., L. K. Bagi, E. J. Bush and B. T. Solow.** 2004. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7173-7178.
- Friedrich, A. W., M. Bielaszewska and H. Karch.** 2002a. Die Diagnostik von Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* Infektionen. *J. Lab. Med.* 26: 183-190.
- Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon and H. Karch.** 2002b. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* 185: 74-84.
- Frydendahl, K.** 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet. Microbiol.* 85: 169-182.

- Gallien, P., H. Klie, S. Lehmann, D. Protz, R. Helmuth, R. Schafer and M. Ehrler. 1994. Nachweis verotoxinbildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftlichen Nutztieren in Sachsen Anhalt. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 107: 331-334.
- Gannon, V. P., C. L. Gyles and R. W. Friendship. 1988. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. Can. J. Vet. Res. 52: 331-337.
- Gannon, V. P., C. L. Gyles and B. P. Wilcock. 1989. Effects of *Escherichia coli* Shiga-like toxins (verotoxins) in pigs. Can. J. Vet. Res. 53: 306-312.
- Gannon, V. P. and C. L. Gyles. 1990. Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. Vet. Microbiol. 24: 89-100.
- Garabal, J. I., E. A. Gonzalez, F. Vazquez, J. Blanco and M. Blanco. 1995. Toxigenic *Escherichia coli* in Spanish piggeries from 1986 to 1991. Vet. Microbiol. 47: 17-25.
- Garabal, J. I., E. A. Gonzalez, F. Vazquez, J. Blanco, M. Blanco and J. E. Blanco. 1996. Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. Vet. Microbiol. 48: 113-123.
- Gentry, M. K. and J. M. Dalrymple. 1980. Qualitative microtiter cytoassay for *Shigella* toxin. J. Clin. Microbiol. 12: 361-366.
- Geuther, E., A. Raschke and M. Wendt. 2004. Etablierung einer immunologischen Markierung von Schweinen mit Hilfe von synthetischen Peptiden. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 111: 238-243.
- Girón, J. A., A. S. Ho and G. K. Schoolnik. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science 254: 710-713.
- Gordon, V. M., S. C. Whipp, H. W. Moon, A. D. O'Brien and J. E. Samuel. 1992. An enzymatic mutant of Shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. Infect. Immun. 60: 485-490.
- Green, B. A., R. J. Neill, W. T. Ruyechan and R. K. Holmes. 1983. Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucaryotic target cells is not plasmid mediated. Infect. Immun. 41: 383-390.
- Gregory, D. W. 1955. Role of β -hemolytic coliform organisms in edema disease of swine. Vet. Med. (Praha) 50: 609-610.
- Grob, P. and D. G. Guiney. 1996. In vitro binding of the *Salmonella dublin* virulence plasmid regulatory protein SpvR to the promoter regions of *spvA* and *spvR*. J. Bacteriol. 178: 1813-1820.
- Gunzer, F. and H. Karch. 1993. Expression of A and B subunits of Shiga-like toxin II as fusions with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology. J. Clin. Microbiol. 31: 2604-2610.
- Gyles, C. L., M. So and S. Falkow. 1974. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 130: 40-49.
- Gyles, C. L., S. A. De Grandis, C. MacKenzie and J. L. Brunton. 1988. Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. Microb. Pathog. 5: 419-426.
- Gyles, C. L. 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. Can. J. Microbiol. 38: 734-746.
- Gyles, C. L. 1994. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. ed. International, C.: CAB International, Wallingford, Oxfordshire, U.K.

- Hazelton, M.** 2003. Investigations of adult sheep vaccinated with Gudair® for protection against ovine Johne's disease. Bachelor of Science in Agriculture degree aus dem Department of Animal Science, The University of Sydney.
- Heidrich, H. J.** 1966. Die Ödemkrankheit der Schweine. Zentralbl. Veterinärmed. [B] 13: 142-148.
- Helgerson, A. F., V. Sharma, A. M. Dow, R. Schroeder, K. Post and N. A. Cornick.** 2006. Edema disease caused by a clone of *Escherichia coli* O147. J. Clin. Microbiol. 44: 3074-3077.
- Hoffmann, C.** 2010. Entwicklung und Prüfung eines Impfstoffes gegen die Ödemkrankheit der Schweine. Vet. Med. Diss. aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Hovde, C. J., S. B. Calderwood, J. J. Mekalanos and R. J. Collier.** 1988. Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 2568-2572.
- Imai, Y., R. Nagai, Y. Ono, T. Ishikawa, H. Nakagami, T. Tanikawa and K. Kurohane.** 2004. Production of secretory immunoglobulin A against Shiga toxin-binding subunits in mice by mucosal immunization. Infect. Immun. 72: 889-895.
- Imberechts, H., H. de Greve, C. Schlicker, H. Bouchet, P. Pohl, G. Charlier, H. Bertschinger, P. Wild, J. Vandekerckhove and J. Van Damme.** 1992. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. Infect. Immun. 60: 1963-1971.
- Imberechts, H., H. de Greve, J. P. Hernalsteens, C. Schlicker, H. Bouchet, P. Pohl, G. Charlier, H. U. Bertschinger, P. Wild and J. Vandekerckhove.** 1993. The role of adhesive F107 fimbriae and of SLT-IIv toxin in the pathogenesis of edema disease in pigs. Zentralbl. Bakteriologie. 278: 445-450.
- Imberechts, H., H. U. Bertschinger, M. Stamm, T. Sydler, P. Pohl, H. De Greve, J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu and P. Lintermans.** 1994. Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea. Vet. Microbiol. 40: 219-230.
- Imberechts H, Wild P, Charlier G, De Greve H, Lintermans P, Pohl P.** 1996. Characterization of F18 fimbrial genes *fedE* and *fedF* involved in adhesion and length of enterotoxemic *Escherichia coli* strain 107/86. Microb. pathog. 21(3): 183-92.
- Imberechts, H., P. Deprez, E. Van Driessche and P. Pohl.** 1997. Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. Vet. Microbiol. 54: 329-341.
- Jackson, M. P., R. J. Neill, A. D. O'Brien, R. K. Holmes and J. W. Newland.** 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 44: 109-114.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik.** 2002. Immunologie. 5. ed. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg - Berlin.
- Jelacic, J. K., T. Damrow, G. S. Chen, S. Jelacic, M. Bielaszewska, M. Ciol, H. M. Carvalho, A. R. Melton-Celsa, A. D. O'Brien and P. I. Tarr.** 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. J. Infect. Dis. 188: 719-729.
- Johansen, M., L. O. Andresen, L. K. Thomsen, M. E. Busch, H. Wachmann, S. E. Jorsal and C. L. Gyles.** 2000. Prevention of edema disease in pigs by passive immunization. Can. J. Vet. Res. 64: 9-14.

- Johnson, W. M., D. R. Pollard, H. Lior, S. D. Tyler and K. R. Rozee.** 1990. Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTE) by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2351-2353.
- Kado, C. I. and S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- Karch, H., F. Gunzer, A. Schwarzkopf and H. Schmidt.** 1993. Molekularbiologie und pathogenetische Bedeutung von Shiga- und Shiga-like Toxinen. *BioEngineering* 3: 39-45.
- Karmali, M. A.** 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 15-38.
- Kaufmann, M., C. Zweifel, M. Blanco, J. E. Blanco, J. Blanco, L. Beutin and R. Stephan.** 2006. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. *J. Food Prot.* 69: 260-266.
- Kausche, F. M., E. A. Dean, L. H. Arp, J. E. Samuel and H. W. Moon.** 1992. An experimental model for subclinical edema disease (*Escherichia coli* enterotoxemia) manifest as vascular necrosis in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 53: 281-287.
- Kennan, R., O. Söderlind and P. Conway.** 1995. Presence of F107, 2134P and Av24 fimbriae on strains of *Escherichia coli* isolated from Swedish piglets with diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 43: 123-129.
- Kernkamp, H. C., D. K. Sorensen, L. J. Hanson and N. O. Nielsen.** 1965. Epizootiology of edema disease in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 146: 353-357.
- Keusch, G. T., M. Jacewicz, D. W. Acheson, A. Donohue-Rolfe, A. V. Kane and R. H. McCluer.** 1995. Globotriaosylceramide, Gb3, is an alternative functional receptor for Shiga-like toxin 2e. *Infect. Immun.* 63: 1138-1141.
- Konadu, E., A. Donohue-Rolfe, S. B. Calderwood, V. Pozsgay, J. Shiloach, J. B. Robbins and S. C. Szu.** 1999. Syntheses and immunologic properties of *Escherichia coli* O157 O- specific polysaccharide and Shiga toxin 1 B subunit conjugates in mice. *Infect. Immun.* 67: 6191-6193.
- Konowalchuk, J., J. I. Speirs and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18: 775-779.
- Kurtz, H. J., M. E. Bergeland and D. M. Barnes.** 1969. Pathologic changes in edema disease of swine. *Am. J. Vet. Res.* 30: 791-806.
- Kwon, D., C. Choi, T. Jung, H. K. Chung, J. P. Kim, S. S. Bae, W. S. Cho, J. Kim and C. Chae.** 2002. Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, STa, STb and STx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhoea or oedema disease in Korea. *Vet. Rec.* 150: 35-37.
- Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209.
- Law, D. and J. Kelly.** 1995. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. *Infect. Immun.* 63: 700-702.
- Le Bouguénec, C. and Y. Bertin.** 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet. Res.* 30: 317-342.
- Leemann, G.** 1993. Häufigkeit von genetischer Resistenz gegen Ödemkrankheit bei Schweinen und Voraussagbarkeit aufgrund von Markersystemen. *Vet. Med. Diss.* aus der Vetsuisse Fakultät, Zürich (Schweiz).

- Lege, N.** 2003. Untersuchung zum Vorkommen von Ödemkrankheit-verursachenden *E. coli* (EDEC) und Shigatoxin 2e-spezifischen Antikörpern beim Schwein. Vet. Med. Diss. aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Leung, P. H., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim and W. C. Yam.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7549-7553.
- Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155: 377-389.
- Lindgren, S. W., J. E. Samuel, C. K. Schmitt and A. D. O'Brien.** 1994. The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. Infect. Immun. 62: 623-631.
- Linggood, M. A. and J. M. Thompson.** 1987. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease. J. Med. Microbiol. 24: 359-362.
- MacLeod, D. L. and C. L. Gyles.** 1990. Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. Infect. Immun. 58: 1232-1239.
- MacLeod, D. L. and C. L. Gyles.** 1991. Immunization of pigs with a purified Shiga-like toxin II variant toxoid. Vet. Microbiol. 29: 309-318.
- MacLeod, D. L., C. L. Gyles and B. P. Wilcock.** 1991. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. Vet. Pathol. 28: 66-73.
- Mainil, J., G. Daube, P. Deprez, A. Kaeckenbeeck and P. Pohl.** 1989. Detection and identification of pathotypes of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from weaned piglets using gene probes for seven *E. coli* toxins. FEMS Microbiol. Lett. 50: 345-349.
- Mainil, J.** 1999. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. Vet. Res. 30: 235-257.
- Makino, S., M. Watarai, H. Tabuchi, T. Shirahata, H. Furuoka, Y. Kobayashi and Y. Takeda.** 2001. Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing *Escherichia coli* is a vaccine candidate for porcine edema disease. Microb. Pathog. 31: 1-8.
- Marcato, P., G. Mulvey, R. J. Read, K. Vander Helm, P. N. Nation, and G. D. Armstrong** 2001. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. J. Infect. Dis. 183: 435-443.
- Marques, L. R. M., J. S. M. Peiris, S. J. Cryz and A. D. O'Brien.** 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Lett. 44: 33-38.
- Matise, I., T. Sirinarumitr, B. T. Bosworth and H. W. Moon.** 2000. Vascular ultrastructure and DNA fragmentation in swine infected with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Vet. Pathol. 37: 318-327.
- Matise, I., N. A. Cornick, S. L. Booher, J. E. Samuel, B. T. Bosworth and H. W. Moon.** 2001. Intervention with Shiga toxin (Stx) antibody after infection by Stx-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 183: 347-350.
- Matise, I., N. A. Cornick, J. E. Samuel and H. W. Moon.** 2003. Binding of shiga toxin 2e to porcine erythrocytes in vivo and in vitro. Infect. Immun. 71: 5194-5201.

- Melton-Celsa, A. R., S. C. Darnell and A. D. O'Brien.** 1996. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 64: 1569-1576.
- Methiyapun, S., J. F. Pohlenz and H. U. Bertschinger.** 1984. Ultrastructure of the intestinal mucosa in pigs experimentally inoculated with an edema disease-producing strain of *Escherichia coli* (O139:K12:H1). *Vet. Pathol.* 21: 516-520.
- Montenegro, M. A., et al.** 1990. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 28(6): 1417-1421.
- Moon, H. W., R. A. Schneider and S. L. Moseley.** 1986. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. *Am. J. Vet. Res.* 47: 210-212.
- Moseley, S. L., P. Echeverria, J. Seriwatana, C. Tirapat, W. Chaicumpa, T. Sakuldaipeara and S. Falkow.** 1982. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J. Infect. Dis.* 145: 863-869.
- Moxley, R. A.** 2000. Edema disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16: 175-185.
- Nagy, B., T. A. Casey and H. W. Moon.** 1990. Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *J. Clin. Microbiol.* 28: 651-653.
- Nagy, B., T. A. Casey, S. C. Whipp and H. W. Moon.** 1992. Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infect. Immun.* 60: 1285-1294.
- Nagy, B., S. C. Whipp, H. Imberechts, H. U. Bertschinger, E. A. Dean-Nystrom, T. A. Casey and E. Salajka.** 1997. Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea. *Microb. Pathog.* 22: 1-11.
- Nagy, B. and P. Z. Fekete.** 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30: 259-284.
- Nagy, B., R. A. Wilson and T. S. Whittam.** 1999. Genetic diversity among *Escherichia coli* isolates carrying *f18* genes from pigs with porcine postweaning diarrhea and edema disease. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1642-1645.
- Nakao, H., K. Kimura, H. Murakami, T. Maruyama and T. Takeda.** 2002. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34: 289-297.
- Nataro, J. P., J. Seriwatana, A. Fasano, D. R. Maneval, L. D. Guers, F. Noriega, F. Dubovsky, M. M. Levine and J. G. Morris, Jr.** 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect. Immun.* 63: 4721-4728.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
- Nataro, J. P., T. Steiner and R. L. Guerrant.** 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 251-261.
- Newland, J. W., N. A. Strockbine, S. F. Miller, A. D. O'Brien and R. K. Holmes.** 1985. Cloning of Shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*. *Science* 230: 179-181.

- Nielsen, N. O.** 1986. Edema disease. in: Leman, A. D., Straw, B., Glock, R. D., Mengeling, W. L., Penny, R. H. C., and Scholl, E. (ed.): Diseases of swine. 6. Aufl., Iowa State University Press, Ames, S. 528-547.
- Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguénec, G. Baljer, S. Franke and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and *stx2e* in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8: 143-149.
- O'Brien, A. D. and G. D. LaVeck.** 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect. Immun. 40: 675-683.
- O'Brien, A. D. and R. K. Holmes.** 1987. Shiga and Shiga-like Toxins. Microbiol. Rev. 51: 206-220.
- O'Brien, A. D., L. R. Marques, C. F. Kerry, J. W. Newland and R. K. Holmes.** 1989. Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933. Microb. Pathog. 6: 381-390.
- O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg and G. T. Keusch.** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 180: 65-94.
- Ohmura-Hoshino, M., S. T. Ho, H. Kurazono, K. Igarashi, S. Yamasaki and Y. Takeda.** 2003. Genetic and immunological analysis of a novel variant of Shiga toxin 1 from bovine *Escherichia coli* strains and development of bead-ELISA to detect the variant toxin. Microbiol. Immunol. 47: 717-725.
- Ojeniyi, B., P. Ahrens and A. Meyling.** 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. Zentralbl. Veterinärmed. [B] 41: 49-59.
- Orban, P. G. Bilkei Papp and A. Bolcskei.** 1993. Bericht über die therapeutische Wirkung von zentralnervösen Stimulantien bei der Ödemkrankheit der Schweine. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 106: 423-425.
- Osek, J. P. Gallien, M. Truszczyński and D. Protz.** 1999. The use of polymerase chain reaction for determination of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs in Poland. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 22: 163-174.
- Osek, J.** 1999a. Genetic diversity among *Escherichia coli* O149:K91 strains isolated from pigs with diarrhoea determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. Res. Vet. Sci. 67: 197-198.
- Osek, J.** 1999b. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. Vet. Microbiol. 68: 209-217.
- Osek, J.** 2000a. Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea by pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. 186: 327-331.
- Osek, J.** 2000b. Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. Vet. Microbiol. 71: 211-222.
- Parma, A. E., M. E. Sanz, M. R. Viñas, M. E. Cicuta, J. E. Blanco, S. I. Boehringer, M. M. Vena, W. R. Roibon, M. C. Benitez, J. Blanco and M. Blanco.** 2000. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. Vet. Microbiol. 72: 269-276.
- Paton, A. W., A. J. Bourne, P. A. Manning and J. C. Paton.** 1995. Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. Infect. Immun. 63: 2450-2458.

- Paton, J. C. and A. W. Paton.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11: 450-479.
- Perera, L. P., L. R. Marques and A. D. O'Brien.** 1988. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 26: 2127-2131.
- Piérard, D., L. Huyghens, S. Lauwers and H. Lior.** 1991. Diarrhoea associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. Lancet 338: 762.
- Piérard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens and S. Lauwers.** 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. J. Clin. Microbiol. 36: 3317-3322.
- Porter, P.** 1986. Immune system, in Diseases of swine. Leman, E. D., B. Straw, R. D. Glock, W. L. Mengeling, R. H. C. Penny and E. Scholl. p. 25. Iowa: Ames, Iowa: Iowa State University Press
- Quattrocchi, V., V. Bianco, N. Fondevila, S. Pappalardo, A. Sadir and P. Zamorano.** 2004. Use of new adjuvants in an emergency vaccine against foot-and-mouth disease virus: evaluation of conferred immunity. Dev. Biol. 119: 481-497.
- Ran XQ, Wang HZ, Liu JJ, Li S, Wang JF.** 2008. The immunogenicity of fusion protein linking the carboxyl terminus of the B subunit of Shiga toxin 2 to the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin. Vet Microbiol. Feb 5;127(1-2):209-15.
- Reyes, L. E., J. González, M. C. Ferreras, C. García-Pariente, J. Benavides, M. Fuertes, J. F. García-Marín and V. Pérez.** 2002. Evaluation of different adjuvants in the vaccination against paratuberculosis in sheep. International Association for Paratuberculosis, Inc. Bilbao, Spanien.
- Rippinger, P., H. U. Bertschinger, H. Imberechts, B. Nagy, I. Sorg, M. Stamm, P. Wild and W. Wittig.** 1995. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. Vet. Microbiol. 45: 281-295.
- Rokicki, E.** 1973. Der Einfluß verschiedener Arten von Einstreu auf Haut- und Rektaltemperaturen beim Schwein. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 80: 157-160.
- Rolle, M. and A. Mayr.** 2002. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage ed. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart.
- Salajka, E., Z. Salajkova, P. Alexa and M. Hornich.** 1992. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. Vet. Microbiol. 32: 163-175.
- Salvadori, M. R., A. T. Yamada and T. Yano.** 2001. Morphological and intracellular alterations induced by cytotoxin VT2y produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome. FEMS Microbiol. Lett. 197: 79-84.
- Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg and H. C. Krivan.** 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. Infect. Immun. 58: 611-618.
- Sandvig, K. and B. van Deurs.** 1996. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. Physiol. Rev. 76: 949-966.
- Sarrazin, E. and H. U. Bertschinger.** 1997. Role of fimbriae F18 for actively acquired immunity against porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. Vet. Microbiol. 54: 133-144.

- Sarrazin, E., C. Fritzsche and H. U. Bertschinger.** 2000. Hauptvirulenzfaktoren bei *Escherichia coli*-Isolaten von über zwei Wochen alten Schweinen mit Ödemkrankheit und/oder Colidiarrhöe. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 142: 625-630.
- Saunders, C. N., A. J. Stevens, J. B. Spence and W. J. Sojka.** 1960. *Escherichia coli* Infection in Piglets. Res. Vet. Sci. 1: 28-35.
- Schägger, H. and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379.
- Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler and H. Karch.** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1205-1208.
- Schmidt, H.** 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. Res. Microbiol. 152: 687-695.
- Schmitt, C. K., M. L. McKee and A. D. O'Brien.** 1991. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. Infect. Immun. 59: 1065-1073.
- Schofield, F. and D. Davis.** 1955. Oedema disease (entero-toxaemia) in swine. II. Experiments conducted in a susceptible herd. Canadian Journal of Comparative Medicine 19: 242.
- Schofield, F. W. and J. D. Schroder.** 1954. Some important aspects of oedema disease in swine (entero-toxemia). Canadian Journal of Comparative Medicine 18: 24-28.
- Scotland, S. M., H. R. Smith, G. A. Willshaw and B. Rowe.** 1983. Vero cytotoxin production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. Lancet 2: 216.
- Scotland, S. M.** 1991. Vero cytotoxins(Shiga-like Toxins) of *Escherichia coli*, in Molecular Pathogenesis of Gastrointestinal infections. Wädstrom. p. 155-160. New York: Plenum Press
- Seriwatana, J., P. Echeverria, D. N. Taylor, L. Rasrinaul, J. E. Brown, J. S. Peiris and C. L. Clayton.** 1988. Type II heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. Infect. Immun. 56: 1158-1161.
- Shanks, P. L.** 1938. An unusual condition affecting the digestive organs of the pig. Vet. Rec. 50: 356-358.
- Shaw, D. J., C. Jenkins, M. C. Pearce, T. Cheasty, G. J. Gunn, G. Dougan, H. R. Smith, M. E. Woolhouse and G. Frankel.** 2004. Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7456-7465.
- Sinclair, J. C., R. Delgoda, M. E. Noble, S. Jarmin, N. K. Goh and E. Sim.** 1998. Purification, Characterization, and Crystallization of an *N*-Hydroxyarylamine O-Acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. Protein Expr. Purif. 12: 371-380.
- Smith, D. B. and K. S. Johnson.** 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene 67: 31-40.
- Smith, H. W.** 1963. The haemolysins of *Escherichia coli*. J. Pathol. Bacteriol. 85: 197-211.
- Smith, H. W. and S. Halls.** 1967. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. J. Pathol. Bacteriol. 93: 531-543.
- Smith, H. W. and S. Halls.** 1968. The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. J. Med. Microbiol. 1: 45-59.

- Smith, H. W. and M. A. Linggood.** 1971. The effect of antisera in protecting pigs against experimental *Escherichia coli* diarrhoea and oedema disease. J. Med. Microbiol. 4: 487-493.
- Smith, H. W., P. Green and Z. Parsell.** 1983. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. J. Gen. Microbiol. 129: 3121-3137.
- Sojka, W. J., R. G. Erskine and M. K. Lloyd.** 1957. Haemolytic *Escherichia coli* and "oedema disease" of pigs. Vet. Rec. 69: 203.
- Sojka, W. J., M. K. Lloyd and E. J. Sweeney.** 1960. *E. coli* serotypes associated with pig disease. Res. Vet. Sci. 1: 17-27.
- Sojka, W. J.** 1965. *Escherichia coli* infections in pigs, in *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. 104-156. Bucks, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, England.
- Sonntag, A. K., M. Bielaszewska, A. Mellmann, N. Dierksen, P. Schierack, L. H. Wieler, M. A. Schmidt and H. Karch.** 2005. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8855-8863.
- Spencer, C. and J. T. Nicoloff.** 1990. Serum TSH Measurement: A 1990 Status Report. Thyroid Today 13: 1-12.
- Stamm, M. and H. Bertschinger.** 1992. Identification of pigs genetically resistant to oedema disease by testing adhesion of *E. coli* expressing fimbriae 107 to intestinal epithelial cells.
- Stein, P. E., A. Boodhoo, G. J. Tyrrell, J. L. Brunton and R. J. Read.** 1992. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. Nature 355: 748-750.
- Strockbine, N. A., L. R. Marques, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1985. Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli*. Infect. Immun. 50: 695-700.
- Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. J. Bacteriol. 170: 1116-1122.
- Suzaki, Y., Y. Ami, N. Nagata, S. Naito, H. Kato, M. Taneichi, M. Takahashi, T. Komiya, S. Satoh, F. Gondaira, J. Sugiyama, Y. Nakano, M. Mori, K. Komuro and T. Uchida.** 2002. Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. Int. Arch. Allergy Immunol. 127: 294-298.
- Tada, H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto.** 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. J. Immunol. Methods 93: 157-165.
- Taddei, C. R., A. C. Moreno, A. Fernandes Filho, L. P. Montemor and M. B. Martinez.** 2003. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. FEMS Microbiol. Lett. 227: 249-253.
- Thomas, A., T. Cheasty, H. Chart and B. Rowe.** 1994. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H- and O101:H-carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13: 1074-1076.
- Timoney, J. F.** 1950. Oedema disease of swine. Vet. Rec. 62: 748-756.
- Tizard, I. R.** 2004. Veterinary Immunology: An Introduction. 7th ed. Elsevier: Philadelphia, U.S.A.

- Tschäpe, H., L. Bender, M. Ott, W. Wittig and J. Hacker.** 1992. Restriction fragment length polymorphism and virulence pattern of the veterinary pathogen *Escherichia coli* O139:K82:H1. Zentralbl. Bakteriol. 276: 264-272.
- Tscholchiew, A.** 2006. Untersuchungen zur Ätiologie und Prophylaxe der Ödemkrankheit von Absetzferkeln: Erregereigenschaften und Immunogenität von Shigatoxoidvakzinen. Vet. Med. Diss. aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Vernozy-Rozand, C., M. P. Montet, Y. Bertin, F. Trably, J. P. Girardeau, C. Martin, V. Livrelli and L. Beutin.** 2004. Serotyping, *stx2* subtyping, and characterization of the locus of enterocyte effacement island of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2556-2559.
- Vögeli, P., H. U. Bertschinger, M. Stamm, C. Stricker, C. Hagger, R. Fries, J. Rapacz and G. Stranzinger.** 1996. Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. Anim. Genet. 27: 321-328.
- Vögeli, P., E. Meijerink, R. Fries, S. Neuenschwander, N. Vorlander, G. Stranzinger and H. U. Bertschinger.** 1997. Ein molekularer Test für den Nachweis des *E.-coli*-F18-Rezeptors: ein Durchbruch im Kampf gegen Ödemkrankheit und Absetzdurchfall beim Schwein. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 139: 479-484.
- Waddell, T., S. Head, M. Petric, A. Cohen and C. Lingwood.** 1988. Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 152: 674-679.
- Waddell, T. E., B. L. Coomber and C. L. Gyles.** 1998. Localization of potential binding sites for the edema disease verotoxin (VT2e) in pigs. Can. J. Vet. Res. 62: 81-86.
- Waldmann, K. H. und M. Wendt.** 2001. Lehrbuch der Schweinekrankheiten. 3. Auflage ed. Berlin: Parey Verlag.
- Wasteson, Y., A. Lund and O. Olsvik.** 1992. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. Vet. Microbiol. 30: 179-190.
- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. J. Bacteriol. 170: 4223-4230.
- Whittam, T. S.** 1998. Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin Producing *E. coli* Strains, in *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin Producing *E. coli* Strains. Kaper, J. B. and A. D. O'Brien. p. 195-209. Washington DC: ASM Press
- Wieler, L. H., R. Bauerfeind and G. Baljer.** 1992. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. Zentralbl. Bakteriol. [Orig] 276: 243-253.
- Wieler, L. H., S. Franke, C. Menge, M. Rose, R. Bauerfeind, H. Karch and G. Baljer.** 1995. Untersuchungen zur Immunantwort bei der Ödemkrankheit von Absetzferkeln mit einer rekombinanten B-Untereinheit des Shiga-like-Toxins-Ile. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 102: 40-43.
- Wittig, W., R. Prager, M. Stamm, W. Streckel and H. Tschäpe.** 1994. Expression and plasmid transfer of genes coding for the fimbrial antigen F107 in porcine *Escherichia coli* strains. Zentralbl. Bakteriol. 281: 130-139.
- Wittig, W., H. Klie, P. Gallien, S. Lehmann, M. Timm and H. Tschäpe.** 1995. Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxins among *Escherichia coli* isolated from weaned pigs. Zentralbl. Bakteriol. 283: 95-104.

- Woodward, M. J., P. J. Carroll and C. Wray.** 1992. Detection of entero- and verocyto-toxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 31: 251-261.
- Yamamoto, T. and P. Echeverria.** 1996. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect. Immun.* 64: 1441-1445.
- Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius and H. Karch.** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx(1c)*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1441-1446.
- Zhang, W., M. Bielaszewska, A. W. Friedrich, T. Kuczius and H. Karch.** 2005. Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 558-561.
- Ziebell, K. A., S. C. Read, R. P. Johnson and C. L. Gyles.** 2002. Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins. *Res. Microbiol.* 153: 289-300.

8 ANHANG

8.1 Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

Blutagar

Blut-Agar	50 g
Schafschüttelblut	50 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

Luria-Bertani-Agar

NaCl	5 g
Hefe-Extract	5 g
Bacto-Trypton	10 g
NaOH 1N	4 ml
Bacto-Agar	16 g
A. dest.	ad 1.000 ml

Luria-Bertani-Medium (pH 8,2)

NaCl	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Bacto-Trypton	10 g
A. dest.	ad 1.000 ml

8.2 Puffer und Lösungen

Acrylamidlösung I

Acrylamid	46,5 g
Bisacrylamid	3 g
A. dest.	ad 100 ml

Acrylamidlösung II

Acrylamid	48,0 g
Bisacrylamid	1,5 g
A. dest.	ad 100 ml

Anodenpuffer für Tricine-PAGE (pH 8,9)

Tris-HCl	24,23 g
A. dest.	ad 1.000 ml

Anodenpuffer I

Tris (1 M)	300 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

Anodenpuffer II

Tris (1 M)	25 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

Blockpuffer

BSA	0,2 g
PBS-Tween	20 ml

Coating-Puffer

Karbonatstammlösung A	85 ml
Karbonatstammlösung B	40 ml
A. dest.	ad 500 ml

Elektrophoresepuffer (50-fach TAE)

Tris	242 g
Essigsäure	57,1 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

Elutionspuffer (pH 3,0)

NaCl	8,77 g
Citronensäure	15,76 g
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	6,68 g
Glycerin, 99 %ig	25 ml
A. dest.	ad 500 ml

Entfärbelösung

Essigsäure, 96 %ig	100 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

Färbelösung

Essigsäure, 96 %ig	100 ml
Serva Blue G	5 mg
A. dest.	ad 1.000 ml

Fixierlösung

Ethanol	250 ml
Essigsäure, 96 %ig	50 ml
A. dest.	ad 500 ml

HEPES-Puffer Stammlösung (10 x, pH 7,4)

NaCl	40 g
KCl	1,5 g
HEPES	11,9 g
D-Glukose (wasserfrei)	10 g
A. dest	ad 500 ml

HEPES-Puffer (1 x, pH 7,4)

HEPES-Puffer-Sammlösung

50 ml

A. dest.

ad 500 ml

Karbonatstammlösung A Na_2CO_3

2,12 g

A. dest.

ad 100 ml

Karbonatstammlösung B NaHCO_3

1,68 g

A. dest.

ad 100 ml

Kathodenpuffer für Blotting

Tris

25 ml

6-Aminocapronsäure

5,25 g

Methanol

200 ml

A. dest.

ad 1.000 ml

Kathodenpuffer für Tricine-PAGE

Tris

24,23 g

Tricine

35,84 g

SDS

2 g

A. dest.

ad 2.000 ml

Lysepuffer (pH 8,0)

Harnstoff

240,24 g

 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

6,9 g

Tris

0,6 g

A. dest.

ad 500 ml

MTT-Stammlösung

MTT

0,5 g

PBS (1-fach)

100 ml

NaCl-Lösung (0,89 %)

NaCl

8,9 g

A. dest.

ad 1.000 ml

PBS (10-fach)

NaCl

100 g

KCl

2,5 g

 KH_2PO_4

2,5 g

 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

18 g

A. dest.

ad 1.000 ml

PBS (1-fach)

PBS (10 x)	100 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

PBS-Tween (pH 7,2)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,94 g
NaCl	16,36 g
Tween 20	1 ml
A. dest.	ad 2.000 ml

Proteinprobenpuffer

Tris-HCl (pH 6,8)	50 mM
SDS	4 % w/v
Glycerin	12 % v/v
Mercaptoethanol	2 % v/v
Serva Blue G	5 mg/l

SDS-Lösung (10 %)

Natriumdodecylsulfat	100 g
HCl 1 N	10 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

SDS-Lösung (1 %)

Natriumdodecylsulfat	0,5 g
NaCl	ad 50 ml

Substratlösung 1

Chloronaphthol	2 ml
PBS (1 x)	8 ml
H_2O_2	5 μl

Substratlösung 2

Chloronaphthol	3 ml
PBS (1 x)	7 ml
H_2O_2	5 μl

Substratpuffer (pH 4,2)

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,34 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,09 g
A. dest.	ad 500 ml

TE-Puffer-2 (pH 8,0)

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

Tricine-Sammelgel (4 %)

Tris-HCl pH 8,4 (3 M)	1 ml
Acrylamid-Lösung II	350 µl
A. dest.	2,75 ml
APS (10 %)	50 µl
TEMED	2,50 µl

Tricine-Trenngel (10 %)

Tris-HCl pH 8,4 (3 M)	5 ml
Glycerin (87 %)	2 ml
Acrylamid-Lösung I	3 ml
A. dest.	5 ml
APS (10 %)	115 µl
TEMED	11,5 µl

Trypanblau-Lösung

Trypanblau	0,20 g
NaCl-Lösung	1.000 ml

Waschpuffer (pH 6,0)

NaCl	8,77 g
Citronensäure	2,10 g
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	13,35 g
Glycerin	25 ml
A. dest.	ad 500 ml

Zellkulturmedium 1

RPMI 1640	880 ml
FCS	100 ml
Penicillin(100. IE/ml)/Streptomycin(10,000 µg/ml)-Lösung	10 ml
Glutamin-Lösung (200 mM)	10 ml

8.3 Einzelwerte aus dem rHis-StxB2e-ELISA

Tabelle 21: Rohdatenliste der Ergebnisse im rHis-StxB2e-ELISA

Be- stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG- Titer [Std. %]	Be- stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG- Titer [Std. %]	Be- stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG- Titer [Std. %]
104	51	19,33	121	238	13,16	124	225	28,20
104	52	32,91	121	239	11,05	124	226	30,52
104	53	14,48	121	240	25,27	124	227	59,28
104	54	20,20	121	241	17,65	124	228	45,00
104	55	20,94	121	242	17,00	124	229	25,19
104	56	22,25	121	243	18,22	125	41	32,35
104	57	28,44	121	244	17,59	125	42	20,98
104	58	30,37	121	245	35,46	125	43	27,53
104	59	28,98	121	246	21,27	125	44	35,13
104	60	43,21	121	247	29,38	125	45	21,53
104	61	14,69	121	248	22,30	125	46	33,76
104	62	25,29	121	249	37,26	125	47	89,79
104	63	17,58	121	251	23,90	125	48	17,43
106	2	20,84	121	252	21,10	125	49	19,77
106	3	19,16	121	253	23,04	125	50	43,94
106	5	12,76	122	1	36,04	125	51	35,51
106	7	25,98	122	3	20,18	125	52	15,68
106	9	28,13	122	4	34,17	125	53	20,90
106	10	31,72	122	5	29,64	127	26	29,04
106	11	21,99	122	6	23,21	127	27	17,18
106	15	12,81	122	7	29,24	127	28	18,90
106	16	16,14	122	8	22,35	127	29	26,61
106	17	9,67	122	9	19,08	127	30	31,24
106	25	23,15	122	10	19,86	127	31	27,91
116	189	6,83	122	11	35,29	127	32	28,82
116	190	13,13	122	12	24,71	127	33	22,31
116	191	11,08	122	13	23,42	127	34	18,90
116	192	36,63	122	14	14,84	127	35	11,68
116	193	33,43	122	15	21,81	127	36	16,23
116	194	27,43	122	16	15,41	127	37	16,97
116	195	18,82	122	17	16,59	127	38	48,05
116	196	24,16	122	18	18,85	127	39	23,66
116	197	26,88	122	19	31,09	127	40	27,08
116	198	16,64	122	20	28,98	128	290	27,19
116	199	25,70	122	21	28,57	128	291	21,54
116	200	22,73	122	22	16,58	128	292	14,51
116	201	16,39	122	23	21,76	128	293	24,72
116	202	22,77	124	30	20,10	128	294	12,01
116	203	15,32	124	31	18,22	128	295	4,33
116	204	12,98	124	32	26,01	128	296	14,59
116	205	8,03	124	218	11,52	128	297	7,85
116	206	6,75	124	219	13,40	128	298	9,70
116	207	5,09	124	220	26,93	128	299	7,26
116	208	18,79	124	221	15,21	128	300	20,02
121	234	16,19	124	222	34,37	128	301	18,11
121	236	28,59	124	223	25,01	128	302	16,21
121	237	21,05	124	224	14,46	128	303	14,94

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
128	304	5,03	139	101	31,41	154	92	10,43
134	103	32,33	139	102	18,42	154	93	29,07
134	105	38,38	144	1	16,80	155	1	34,04
134	107	50,88	144	3	19,13	155	11	26,82
134	108	15,70	144	4	25,45	155	12	22,15
134	109	24,80	144	5	38,32	155	13	22,18
134	110	24,52	144	6	13,63	155	15	21,49
134	111	43,86	144	7	14,46	155	16	24,12
134	112	41,13	144	8	20,56	155	17	25,43
134	115	43,06	144	9	15,54	155	19	21,77
134	116	32,78	144	10	19,53	155	20	26,11
134	118	25,16	144	11	17,27	155	22	28,28
134	119	22,95	144	12	33,99	155	24	25,95
134	121	23,62	144	13	13,76	155	25	33,99
134	122	26,61	144	14	12,77	155	26	22,30
136	114	17,04	144	15	13,01	155	27	24,80
136	115	39,20	144	16	12,00	155	28	22,06
136	116	7,30	144	17	14,72	155	29	24,77
136	117	34,31	144	18	21,92	155	30	33,88
136	118	20,26	144	19	13,55	155	31	25,60
136	119	9,66	144	20	14,96	155	32	26,32
136	120	21,24	144	21	34,38	155	33	20,40
136	121	32,53	144	22	22,38	155	34	21,02
136	122	17,01	144	23	12,98	155	35	65,09
136	123	10,11	144	24	6,49	155	36	43,87
136	124	17,18	144	25	18,23	155	37	44,25
136	125	35,43	148	21	20,19	155	38	30,37
136	126	29,40	148	22	27,52	155	39	46,31
136	127	16,66	148	23	31,75	155	40	46,79
136	128	13,04	148	24	29,15	161	21	39,18
136	129	15,74	148	25	13,28	161	22	38,24
136	130	13,39	152	50	25,14	161	23	29,69
136	131	41,84	152	51	20,43	161	24	42,78
136	132	17,65	152	52	13,63	161	25	25,53
136	133	17,59	152	53	19,09	161	26	36,41
139	83	28,07	152	54	16,79	161	27	35,82
139	84	35,15	152	55	17,84	161	28	45,31
139	85	28,45	152	56	16,07	161	29	45,43
139	86	20,00	152	57	16,10	161	30	24,01
139	87	26,35	152	58	13,67	161	31	28,48
139	88	23,94	152	59	15,37	161	32	33,13
139	89	23,83	152	60	17,63	161	33	41,66
139	90	20,09	154	81	9,92	161	34	64,20
139	91	18,06	154	82	10,38	161	35	34,92
139	92	24,21	154	83	11,69	161	36	38,63
139	93	30,42	154	84	11,14	161	37	44,51
139	94	23,38	154	85	11,14	161	38	36,10
139	95	25,97	154	86	10,78	161	39	40,86
139	96	110,51	154	87	9,68	161	40	44,31
139	97	23,65	154	88	7,50	162	61	33,52
139	98	13,73	154	89	7,61	162	62	32,12
139	99	15,67	154	90	21,92	162	63	48,38
139	100	22,91	154	91	8,38	162	64	51,94

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
162	65	23,87	174	213	48,60	222	21	19,27
162	67	26,26	174	214	42,60	222	22	31,50
162	68	35,27	174	215	41,80	222	23	14,70
162	69	41,59	174	216	42,15	222	24	24,41
162	70	25,88	174	217	23,60	222	25	27,54
162	71	29,85	207	8	28,34	231	1	53,78
162	72	42,09	207	9	29,08	231	2	25,45
162	73	17,84	207	10	27,93	231	4	21,58
162	74	33,26	207	11	29,23	231	5	23,93
171	177	21,74	207	12	19,88	231	6	26,32
171	178	25,37	207	13	16,18	231	7	49,78
171	179	20,43	207	16	18,80	231	8	25,49
171	180	23,82	207	17	29,08	231	9	24,64
171	181	29,27	207	18	26,40	231	10	29,26
171	182	30,82	207	19	21,92	231	11	22,28
171	183	38,10	207	20	21,43	231	12	34,28
171	184	33,55	207	21	25,47	231	14	32,03
171	185	25,55	207	22	30,43	231	15	38,96
171	186	33,02	207	23	37,95	231	16	34,73
171	187	40,69	207	24	21,68	231	17	26,94
171	188	36,08	207	25	10,90	231	18	20,07
171	189	38,31	207	26	17,50	231	19	23,62
171	190	21,38	207	27	21,41	231	20	31,64
171	191	25,50	207	28	32,13	232	21	18,54
171	192	13,10	207	29	26,86	232	22	15,02
171	193	27,71	207	30	24,95	232	23	13,21
171	194	20,57	207	31	21,68	232	24	8,92
171	195	17,90	207	32	40,41	232	25	41,26
171	196	20,72	207	33	20,32	232	26	12,70
171	197	24,40	208	17	28,01	232	27	13,78
173	1	34,56	208	18	25,47	232	28	23,82
173	2	41,60	208	19	31,28	232	29	16,24
173	3	33,17	208	20	29,15	232	30	37,91
173	4	46,18	208	22	17,83	232	31	35,18
173	5	27,34	222	1	21,67	232	32	31,80
173	46	34,58	222	2	26,85	232	33	29,13
173	47	30,75	222	3	29,21	232	34	32,22
173	48	40,36	222	4	24,61	232	35	17,22
174	198	37,67	222	5	25,45	232	36	24,90
174	199	32,08	222	6	10,84	232	37	20,36
174	200	33,44	222	7	14,19	232	38	35,51
174	201	25,36	222	8	55,86	232	39	25,67
174	202	51,08	222	9	18,00	232	40	18,05
174	203	43,69	222	10	21,21	235	1	41,05
174	204	41,30	222	11	23,85	235	2	45,17
174	205	38,33	222	12	29,68	235	3	30,26
174	206	31,88	222	13	31,16	235	4	27,81
174	207	36,65	222	14	14,27	235	5	27,23
174	208	42,84	222	15	31,95	235	6	16,42
174	209	42,56	222	16	14,56	235	7	20,97
174	210	39,55	222	17	37,09	235	8	26,29
174	211	39,19	222	18	18,48	235	9	27,84
174	212	31,44	222	19	18,45	235	10	26,09

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
235	11	28,89	241	29	23,23	302	19	41,52
235	12	27,90	241	30	13,44	302	20	37,98
235	13	26,67	241	32	23,31	302	21	17,80
235	14	37,10	241	33	19,89	302	22	19,72
235	15	18,46	241	35	39,30	302	23	19,75
235	16	17,85	241	36	25,07	302	24	19,58
235	17	19,62	241	37	25,05	302	25	19,64
235	18	24,18	241	38	21,06	308	1	28,08
235	19	21,79	241	39	26,74	308	2	45,25
235	20	35,02	241	40	23,42	308	4	30,92
238	41	18,57	301	1	35,18	308	7	28,18
238	42	17,07	301	2	44,26	308	8	23,99
238	43	13,28	301	3	49,31	308	9	33,49
238	44	13,55	301	4	29,95	308	10	30,84
238	45	13,58	301	5	48,77	308	12	28,00
238	46	13,82	301	6	30,75	308	13	14,43
238	47	8,69	301	7	39,96	308	14	14,05
238	48	17,23	301	8	49,78	308	15	12,30
238	49	33,17	301	9	41,30	308	16	16,64
238	50	15,02	301	10	53,67	308	17	28,92
238	51	19,98	301	11	25,15	308	20	20,51
238	52	12,00	301	12	65,28	308	21	20,89
238	53	15,05	301	13	41,06	308	22	16,12
238	54	29,48	301	14	30,89	308	24	20,82
238	55	12,78	301	15	45,60	308	25	10,63
238	56	14,39	301	16	30,69	308	26	20,64
238	57	13,01	301	17	41,99	308	28	35,24
238	58	11,71	301	18	39,02	308	29	24,46
238	59	17,38	301	19	59,71	308	30	22,78
238	60	11,71	301	20	47,31	308	31	20,02
241	1	18,31	301	21	32,92	308	32	21,37
241	2	41,68	301	22	29,65	308	33	17,67
241	3	31,41	301	23	33,80	308	34	14,27
241	4	25,13	301	24	38,16	320	26	28,48
241	5	21,23	301	25	54,11	320	27	20,97
241	6	21,37	302	1	21,61	320	29	20,49
241	7	18,05	302	2	13,45	320	30	40,77
241	8	25,63	302	3	10,64	320	32	23,54
241	9	18,19	302	4	22,54	320	33	26,71
241	10	21,92	302	5	21,81	320	34	22,88
241	11	21,89	302	6	25,56	320	35	32,69
241	13	20,62	302	7	27,02	320	36	26,29
241	15	15,36	302	8	27,66	320	39	24,00
241	16	16,77	302	9	20,79	320	41	33,38
241	17	27,26	302	10	17,43	320	42	29,79
241	18	20,96	302	11	33,68	320	43	25,93
241	19	23,23	302	12	25,10	320	45	38,09
241	20	20,82	302	13	19,41	327	26	29,90
241	21	21,97	302	14	23,69	327	27	20,44
241	23	25,33	302	15	31,11	327	28	20,68
241	24	26,01	302	16	28,10	327	29	22,37
241	25	16,84	302	17	29,77	327	30	20,88
241	26	24,44	302	18	41,71	327	31	19,10

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
327	32	27,57	405	66	28,79	417	4	17,34
327	33	27,20	405	67	22,38	417	5	22,34
327	34	27,84	405	68	11,69	417	6	22,71
327	35	22,77	405	69	9,82	417	7	22,80
327	36	26,56	405	70	12,23	417	8	37,62
327	37	26,91	405	71	14,46	417	9	30,84
327	38	15,49	405	72	30,84	417	11	29,40
327	39	24,23	405	73	38,77	417	13	9,15
327	40	10,99	405	74	34,11	417	14	29,55
327	41	38,45	405	75	23,15	417	15	30,72
327	42	36,88	405	76	32,91	417	16	43,92
327	43	38,10	405	77	20,84	417	17	26,11
327	44	19,41	405	78	33,54	417	18	40,64
327	45	12,83	405	79	37,43	417	19	27,26
327	46	34,90	405	80	37,72	417	20	25,86
327	47	9,89	405	81	13,52	417	21	20,73
327	48	21,07	405	82	9,59	417	22	21,72
327	49	15,79	405	83	17,48	417	23	23,93
327	50	12,74	405	84	33,06	417	24	27,23
402	1	30,38	405	85	32,83	417	25	28,75
402	2	21,36	405	86	21,12	419	1	26,73
402	3	22,11	405	87	17,28	419	2	25,96
402	4	19,84	405	88	36,12	419	3	33,87
402	5	21,94	405	89	20,95	419	4	18,40
402	6	23,66	405	90	25,93	419	5	21,26
402	7	18,15	407	26	14,72	419	6	18,10
402	8	24,22	407	27	21,07	419	7	18,19
402	9	24,79	407	28	26,39	419	8	21,17
402	10	19,30	407	29	24,99	419	9	27,00
402	11	17,94	407	30	28,57	419	10	18,43
402	12	31,03	407	31	29,86	419	11	22,05
402	13	21,51	407	32	33,90	419	12	36,10
402	14	22,85	407	33	25,53	419	13	26,06
402	15	35,44	407	34	23,35	419	14	17,49
402	16	27,00	407	35	24,57	419	15	26,36
402	17	25,83	407	36	43,60	419	16	13,68
402	18	37,53	407	37	40,46	419	17	24,90
402	19	16,97	407	38	23,53	419	18	12,08
402	20	46,10	407	39	23,79	419	19	16,33
405	51	25,82	407	40	31,32	419	20	12,87
405	52	28,37	407	41	29,21	419	21	10,63
405	53	39,49	407	42	23,97	419	22	10,74
405	55	48,40	407	43	23,34	419	23	14,93
405	56	46,00	407	44	23,25	419	24	10,71
405	57	27,24	407	45	26,08	419	25	26,60
405	58	28,24	407	46	23,58	429	1	19,81
405	59	20,96	407	47	23,85	429	2	38,16
405	60	27,38	407	48	29,66	429	3	44,07
405	61	30,23	407	49	31,21	429	4	16,77
405	62	36,41	407	50	30,20	429	5	62,95
405	63	30,31	417	1	28,29	429	7	16,73
405	64	18,76	417	2	20,78	429	8	23,63
405	65	24,68	417	3	25,85	429	9	19,17

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
429	10	22,75	436	16	70,95	505	24	49,17
429	11	20,07	436	17	49,48	505	25	29,66
429	12	26,98	436	18	19,98	508	1	34,62
429	13	28,97	436	19	17,29	508	2	39,05
429	14	23,97	436	20	18,61	508	3	25,91
429	15	23,37	436	21	60,76	508	5	31,72
429	16	30,01	436	22	26,30	508	6	27,28
429	17	26,04	436	23	87,87	508	7	22,59
429	18	9,97	436	24	29,95	508	8	40,07
429	19	17,58	436	25	24,53	508	9	33,94
429	20	20,68	436	26	44,22	508	10	26,70
429	21	15,57	436	27	23,61	508	11	30,57
429	22	29,30	436	28	35,74	508	12	31,99
429	23	17,91	436	29	37,34	508	13	33,44
429	24	30,85	436	30	24,45	508	14	22,95
429	25	15,16	503	1	22,62	508	15	33,12
429	26	21,36	503	2	38,13	508	16	21,45
429	27	70,19	503	3	21,72	508	17	42,25
429	28	53,92	503	4	19,74	508	18	29,51
429	29	44,63	503	5	24,30	508	19	39,65
434	51	53,86	503	6	39,73	508	20	30,72
434	52	19,91	503	7	30,08	508	21	22,98
434	53	29,26	503	8	20,10	508	22	23,84
434	54	65,66	503	9	23,52	508	26	28,98
434	55	46,57	503	10	23,13	508	27	19,82
434	56	36,32	503	11	16,19	508	28	24,95
434	57	47,55	503	12	24,67	508	29	21,13
434	58	69,62	503	13	13,48	508	30	39,03
434	59	76,05	503	14	33,71	509	12	43,27
434	60	73,73	503	15	25,05	509	13	39,81
434	61	46,33	503	16	28,91	509	14	20,86
434	62	42,70	503	17	31,28	509	16	36,66
434	63	54,59	503	18	25,38	509	17	85,55
434	64	107,16	503	19	46,10	509	18	53,81
434	65	40,74	503	20	21,97	509	19	41,90
434	66	66,24	505	1	23,21	509	22	34,58
434	68	51,86	505	2	25,30	509	23	20,66
434	69	119,24	505	3	26,88	518	1	24,82
434	70	40,54	505	4	18,81	518	2	50,40
434	72	25,79	505	5	34,78	520	1	36,79
434	73	50,33	505	6	35,74	520	2	33,82
434	74	32,21	505	7	52,81	520	3	24,17
434	75	60,51	505	8	48,34	520	5	42,75
436	6	87,30	505	9	29,68	520	6	40,78
436	7	41,91	505	10	46,37	520	7	46,20
436	8	40,60	505	11	32,33	520	8	28,10
436	9	48,17	505	14	38,15	520	9	31,83
436	10	53,59	505	15	35,96	520	10	28,16
436	11	48,43	505	16	34,95	520	11	29,68
436	12	47,78	505	17	32,73	520	12	40,20
436	13	56,36	505	18	27,65	520	13	23,29
436	14	49,61	505	19	33,28	520	14	25,78
436	15	37,89	505	21	28,48	520	15	23,80

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
520	16	43,44	529	5	26,66	608	11	17,29
520	17	24,28	529	6	24,14	608	12	16,17
520	18	33,51	529	7	15,73	608	13	20,84
520	19	41,49	529	8	26,25	608	14	17,62
520	20	28,29	529	9	44,87	608	15	22,05
520	21	23,10	529	10	21,98	608	16	16,88
520	22	26,60	529	11	23,32	608	18	20,99
520	23	16,89	529	12	19,31	608	19	26,78
520	24	26,04	529	13	24,86	608	20	27,36
520	25	31,34	529	14	28,70	608	21	20,87
522	26	35,40	529	15	49,23	608	22	31,24
522	27	18,29	529	16	39,61	608	23	25,87
522	28	18,06	529	17	22,07	608	24	19,26
522	29	10,64	529	18	28,47	608	25	15,91
522	30	15,54	529	19	29,56	612	2	22,78
522	31	27,00	529	20	28,79	612	3	43,45
522	32	24,33	529	21	12,73	612	4	40,50
522	33	51,35	529	22	10,39	612	5	41,04
522	35	18,51	529	23	10,25	612	6	34,63
525	4	17,97	529	24	31,36	612	7	14,32
525	6	26,73	529	25	36,69	612	8	25,80
525	8	35,76	538	26	41,75	612	9	18,73
525	11	17,86	538	27	24,65	612	10	11,92
525	16	27,32	538	28	25,46	612	11	20,60
525	18	27,27	538	29	32,14	612	12	47,31
525	20	19,10	538	30	30,93	612	13	24,52
525	21	74,33	538	31	37,64	612	14	20,54
525	22	16,01	538	32	41,50	612	15	25,22
525	24	24,07	538	33	22,10	612	16	24,99
526	49	18,14	538	34	26,73	612	17	30,85
526	50	19,76	538	35	35,70	612	18	28,32
526	51	22,86	603	26	24,63	612	19	35,26
526	52	41,12	603	27	23,80	612	20	27,94
526	53	23,99	603	28	19,20	612	21	49,73
526	54	36,79	603	29	31,33	612	22	29,21
526	55	17,62	603	30	29,62	612	23	21,89
526	56	31,65	603	31	30,76	612	24	13,24
526	57	31,11	603	32	30,54	614	31	31,43
526	58	17,93	603	33	19,23	614	32	22,97
526	59	9,80	603	34	23,83	614	33	26,47
526	60	14,69	603	35	25,11	614	34	42,42
526	61	10,72	603	36	14,26	614	35	43,60
526	62	16,31	603	37	25,42	614	36	33,21
526	63	11,99	603	38	24,96	614	37	21,02
526	64	25,39	608	1	30,18	614	38	36,25
526	65	21,13	608	2	8,07	614	39	21,64
526	66	19,66	608	3	22,40	614	40	26,24
526	67	19,57	608	4	11,34	614	41	15,98
526	68	32,00	608	5	21,14	614	42	16,72
529	1	37,38	608	6	16,10	614	43	20,75
529	2	32,83	608	7	15,03	614	44	16,28
529	3	26,99	608	8	25,18	614	45	14,65
529	4	31,31	608	10	19,07	614	46	13,45

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
614	47	14,24	621	45	23,97	631	85	25,67
614	48	24,77	621	46	24,26	635	1	21,43
614	49	47,01	621	47	17,99	635	2	27,70
614	50	20,70	621	48	34,85	635	3	20,71
620	1	18,91	621	49	25,51	635	4	32,21
620	2	54,11	621	50	23,66	635	5	30,84
620	3	37,32	621	51	21,22	635	6	30,55
620	4	13,60	621	52	30,84	635	7	41,31
620	5	21,34	621	53	32,49	635	8	16,17
620	6	34,92	621	54	29,37	635	9	38,15
620	7	34,16	621	55	26,02	635	10	30,81
620	8	17,85	623	1	23,63	635	11	37,60
620	9	16,79	623	2	19,35	635	12	29,75
620	10	25,28	623	3	19,98	635	13	27,40
620	11	31,62	623	4	37,11	635	14	47,30
620	12	29,17	623	5	26,74	635	15	18,02
620	13	26,03	623	6	25,24	635	16	19,10
620	14	24,12	623	7	29,23	635	17	33,19
620	15	23,32	623	8	36,62	635	18	29,40
620	16	32,23	623	9	40,25	635	19	17,15
620	17	58,18	623	10	30,26	635	20	29,75
620	18	46,25	623	11	27,92	635	21	18,96
620	19	32,37	623	12	27,49	635	22	16,07
620	20	54,61	623	13	28,13	635	23	21,84
620	21	30,67	623	14	22,38	635	24	31,15
620	22	16,68	623	15	24,78	635	25	20,44
620	23	52,50	623	16	21,77	637	41	35,08
620	24	43,68	623	17	23,41	637	42	23,44
620	25	28,96	623	18	40,13	637	43	19,70
620	26	34,40	623	19	34,98	637	44	50,30
620	27	18,94	623	20	25,58	637	45	30,22
620	28	21,80	623	21	30,78	637	46	43,79
620	29	25,01	623	22	25,30	637	47	39,81
620	30	36,55	623	23	26,08	637	48	27,34
621	26	34,70	623	24	20,88	637	49	35,78
621	27	20,20	623	25	21,16	637	50	39,65
621	28	27,35	631	68	4,88	637	51	19,65
621	29	28,52	631	69	43,05	637	52	106,36
621	30	14,10	631	70	19,21	637	53	29,84
621	31	15,79	631	71	42,33	637	54	34,17
621	32	20,23	631	72	26,78	637	55	106,98
621	33	24,86	631	73	29,05	637	56	25,83
621	34	31,48	631	74	25,70	637	57	31,22
621	35	29,18	631	75	40,21	637	58	19,81
621	36	22,12	631	76	21,63	637	59	26,19
621	37	31,77	631	77	45,09	637	60	39,45
621	38	28,72	631	78	21,89	637	61	30,26
621	39	20,43	631	79	17,09	637	62	48,69
621	40	47,86	631	80	29,40	637	63	75,69
621	41	29,75	631	81	44,60	637	64	56,55
621	42	26,30	631	82	21,19	637	65	22,20
621	43	23,74	631	83	22,89	639	71	24,02
621	44	17,58	631	84	23,48	639	72	26,49

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
639	73	29,42	654	22	32,53	659	25	17,36
639	74	32,21	654	23	23,39	659	26	15,63
639	75	19,03	654	24	22,48	659	27	20,36
639	76	12,76	654	25	23,59	659	28	29,66
639	77	27,51	654	26	23,92	659	29	29,58
639	78	30,79	654	27	29,60	659	30	21,52
639	79	22,81	654	28	32,09	659	31	15,74
639	80	18,72	654	29	29,13	659	32	19,56
639	81	26,76	654	30	27,89	659	33	19,00
639	82	33,56	654	31	21,69	659	34	27,49
639	83	16,57	654	32	42,61	659	35	16,14
639	85	21,16	654	33	24,67	659	36	63,57
639	86	37,59	654	34	20,84	659	37	47,04
639	87	32,92	654	35	18,27	659	38	45,82
639	88	27,62	654	36	11,84	659	39	46,02
639	89	20,49	654	37	16,90	659	40	34,70
639	90	18,27	654	38	28,99	664	1	44,74
639	91	31,92	654	39	24,20	664	2	32,97
639	92	26,23	654	40	32,38	664	3	34,79
639	93	24,34	654	41	23,04	664	4	29,80
639	94	24,04	654	42	14,57	664	5	25,01
639	95	48,47	654	43	24,12	664	7	53,50
639	96	32,33	654	44	26,58	664	8	31,73
639	97	32,56	654	45	20,21	664	9	37,88
639	98	27,31	654	46	20,84	664	11	39,33
639	99	32,61	654	47	63,70	664	12	44,44
639	100	63,02	654	48	23,96	664	13	40,46
642	1	57,43	654	49	20,95	664	14	24,36
642	2	29,22	654	50	36,52	664	15	25,82
642	3	26,95	659	1	34,66	664	16	35,35
642	4	49,84	659	2	43,40	664	17	30,32
642	5	30,46	659	3	26,34	664	18	31,25
642	6	36,47	659	4	24,97	664	20	25,60
642	7	30,21	659	5	39,77	664	21	34,13
642	8	17,74	659	6	38,32	664	22	30,61
642	9	24,47	659	7	41,56	664	24	29,36
642	10	27,56	659	8	27,16	664	25	30,71
642	11	28,42	659	9	29,76	664	26	30,59
642	12	25,49	659	10	26,93	664	27	32,22
642	13	35,04	659	11	32,31	664	28	28,63
642	14	36,69	659	12	26,77	664	29	34,99
642	15	22,17	659	13	43,76	664	30	24,67
642	16	36,66	659	14	41,14	664	31	30,51
642	17	29,03	659	15	32,50	664	32	34,97
642	18	38,80	659	16	36,26	664	34	20,24
642	19	28,07	659	17	37,05	664	35	20,40
642	20	31,93	659	18	27,31	666	26	14,62
642	21	32,25	659	19	31,54	666	27	15,78
642	22	20,11	659	20	31,32	666	28	21,22
642	23	33,32	659	21	16,65	666	29	16,79
642	24	31,81	659	22	30,83	666	30	49,78
642	25	51,23	659	23	31,53	666	31	34,98
654	21	41,33	659	24	23,47	666	32	51,90

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
666	33	91,42	669	38	31,08	719	24	39,05
666	34	42,89	669	39	47,55	719	27	30,41
666	36	38,41	669	40	40,74	719	30	30,86
666	37	29,86	679	39	24,28	723	51	32,59
666	39	56,91	679	40	30,18	723	52	18,77
666	40	50,31	679	41	30,07	723	53	23,31
666	41	41,23	679	42	26,37	723	54	18,96
666	42	37,57	679	43	18,60	723	55	19,02
666	43	49,69	679	44	30,85	723	56	29,84
666	44	38,96	679	45	22,96	723	57	15,67
666	45	52,41	679	46	24,49	723	58	27,49
666	46	42,12	679	47	19,20	723	59	27,35
666	47	33,20	679	48	20,68	723	60	27,57
666	48	39,13	679	49	30,03	723	61	28,78
666	49	36,34	679	50	28,55	723	62	24,41
666	50	49,70	711	1	11,73	723	63	14,89
669	1	47,16	711	2	47,68	723	65	25,70
669	2	40,04	711	3	17,48	723	66	25,86
669	3	37,36	711	4	17,59	723	67	17,69
669	4	38,73	711	5	15,44	726	1	7,80
669	5	52,29	711	6	22,05	726	2	33,06
669	6	42,23	711	7	33,95	726	3	31,28
669	7	23,43	711	8	39,50	726	4	33,28
669	8	44,73	711	9	40,36	726	5	38,65
669	9	48,44	711	10	32,18	726	6	21,99
669	10	68,40	711	11	23,82	726	7	31,17
669	11	54,06	711	12	24,82	726	8	33,14
669	12	76,51	711	13	39,92	726	9	35,47
669	13	75,43	711	14	31,26	726	12	37,61
669	14	49,66	711	15	36,12	726	13	30,10
669	15	56,67	711	16	10,36	726	14	36,70
669	16	42,09	711	17	17,14	726	15	35,44
669	17	54,99	714	23	15,61	726	16	17,35
669	18	57,62	714	25	8,03	726	17	20,26
669	19	38,23	714	26	20,24	726	18	24,35
669	20	64,39	714	27	44,75	726	19	29,07
669	21	23,00	714	28	51,77	726	20	49,34
669	22	23,54	714	29	37,87	726	21	14,07
669	23	43,51	714	30	18,90	726	22	33,16
669	24	21,33	714	31	32,19	726	24	40,42
669	25	38,95	714	32	27,56	726	25	26,77
669	26	37,24	714	33	20,59	734	1	30,12
669	27	31,45	714	34	17,30	734	2	11,85
669	28	37,06	714	35	18,89	734	3	16,72
669	29	41,87	714	36	22,66	734	4	22,10
669	30	30,69	714	37	26,93	734	5	23,86
669	31	39,43	714	38	24,86	734	7	17,70
669	32	42,23	719	1	35,12	734	8	39,83
669	33	18,44	719	3	48,98	734	9	21,18
669	34	47,69	719	7	30,74	735	1	32,22
669	35	26,23	719	8	32,06	735	3	22,02
669	36	24,42	719	11	33,86	735	4	35,98
669	37	38,63	719	17	26,32	735	5	23,91

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
735	7	28,87	748	18	28,54	754	46	23,88
735	8	37,57	748	19	17,96	754	47	13,48
735	9	29,57	748	20	25,41	754	48	18,18
735	10	29,49	748	21	23,51	754	49	18,06
735	11	32,86	748	22	25,90	754	50	33,13
735	12	27,87	748	23	30,76	754	51	36,42
735	13	35,37	748	24	24,80	754	52	30,32
735	14	38,73	748	25	24,77	754	53	28,15
735	15	38,87	752	41	22,82	754	54	27,95
735	16	32,10	752	42	36,86	754	55	24,62
735	17	24,84	752	43	34,20	754	56	27,43
735	18	23,74	752	44	35,09	754	57	26,36
735	19	23,21	752	45	28,21	754	58	29,51
735	20	35,33	752	46	27,02	754	59	39,16
735	21	29,79	752	47	28,57	754	60	27,69
735	22	23,60	752	48	21,63	755	6	30,92
735	23	26,19	752	49	25,97	755	7	23,67
735	24	17,72	752	50	20,95	755	8	22,68
735	25	22,95	752	51	28,05	755	9	32,20
742	1	33,16	752	52	25,85	755	10	28,67
742	2	27,89	752	53	20,45	755	11	26,94
742	3	32,11	752	56	28,76	755	12	37,73
742	5	36,20	752	57	27,52	755	13	31,10
742	6	42,27	752	58	29,91	755	14	38,00
742	7	32,11	752	59	23,51	757	1	37,30
742	8	39,83	752	60	35,72	757	2	19,55
742	9	36,20	752	61	38,32	757	3	40,89
742	10	27,16	752	62	36,45	757	4	20,97
742	11	39,97	752	63	31,82	757	5	22,81
742	12	27,35	752	64	40,98	757	6	17,99
742	13	44,48	752	65	24,01	757	7	20,20
742	14	20,25	753	1	26,49	757	8	19,92
742	15	42,07	753	2	35,03	757	9	28,22
742	16	24,35	753	3	28,16	757	10	26,87
742	17	29,07	753	4	24,40	757	11	17,18
742	18	26,90	753	5	10,35	757	12	20,09
742	19	14,07	753	6	23,61	757	13	27,88
742	20	33,16	753	7	45,93	757	14	21,64
748	1	40,42	753	8	36,53	757	15	42,23
748	2	26,77	753	9	34,24	757	16	2,96
748	3	25,42	753	10	42,44	759	1	17,35
748	4	11,85	753	11	27,73	759	2	13,06
748	7	16,72	753	12	30,60	759	3	24,86
748	8	22,10	753	13	27,81	759	4	16,87
748	9	23,86	753	14	23,36	759	5	36,52
748	10	17,70	753	15	49,02	759	6	25,37
748	11	16,57	753	16	36,42	759	7	17,81
748	12	20,39	753	18	19,57	759	8	13,58
748	13	17,63	753	19	26,20	759	9	14,74
748	14	22,24	754	42	28,34	759	10	18,75
748	15	25,52	754	43	19,04	759	11	28,61
748	16	36,16	754	44	17,68	759	12	20,20
748	17	24,50	754	45	19,80	759	13	37,82

Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]	Be-stand Nr.	Sau Nr.	Serum-IgG-Titer [Std. %]
759	14	30,59	762	8	36,87	769	22	31,05
759	15	14,36	762	9	35,86	769	23	26,59
759	16	16,36	762	10	44,20	769	24	30,58
759	17	27,73	762	11	37,30	769	25	30,73
759	18	22,14	762	12	36,71	769	26	22,52
759	19	22,79	762	17	44,93	769	27	25,97
759	20	25,29	762	18	22,99	770	1	28,69
759	21	16,90	762	19	36,01	770	2	21,84
759	22	15,04	762	20	49,70	770	3	19,55
759	25	24,94	764	1	26,57	770	4	29,56
761	26	16,00	764	2	31,48	770	5	23,48
761	27	28,22	764	3	30,75	772	66	31,71
761	28	30,97	764	5	25,95	772	67	49,31
761	29	35,08	764	7	24,64	772	68	54,82
761	30	17,37	764	9	28,12	772	69	30,92
761	31	28,66	764	10	44,20	772	70	29,56
761	32	25,04	764	11	34,71	772	71	33,44
761	33	24,01	764	12	36,61	772	72	35,19
761	35	32,27	764	13	28,09	772	73	34,91
761	36	29,72	768	1	39,91	772	74	54,34
761	37	22,17	768	2	26,95	772	75	37,31
761	38	37,72	768	3	28,45	772	76	26,71
761	39	21,97	768	4	41,78	772	77	43,17
761	41	37,92	768	5	30,43	772	78	38,09
761	43	23,22	768	6	29,89	772	79	40,76
761	44	42,95	768	7	35,15	772	80	43,51
761	45	31,20	768	8	49,96	772	81	37,84
761	46	33,92	768	9	42,57	772	82	29,06
761	47	24,50	768	10	43,19	772	83	35,05
761	48	53,79	768	11	36,85	772	84	21,00
761	50	28,28	768	12	42,57	772	85	36,57
762	2	31,32	768	13	35,66	772	86	34,05
762	3	32,81	768	14	26,12	772	87	31,58
762	4	28,91	768	15	38,93	772	88	52,46
762	5	58,91	768	16	34,12	772	89	51,39
762	6	15,73	768	17	29,40	772	90	40,10
762	7	36,82	769	21	35,74			

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind für die fachliche Betreuung, die wertvollen Hinweise zur Planung und Durchführung der Experimente sowie zur Abfassung und Korrektur dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer für die Überlassung des Themas, das Bereitstellen des Arbeitsplatzes sowie der notwendigen Arbeitsmittel danken.

Frau Dr. Stefanie Barth danke ich für die fachliche Betreuung und die Unterstützung bei der Abfassung der Dissertation.

Für die Überlassung der Serumproben bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn AkOR Dr. Christian Bauer und Herrn Dr. I Made Damriyasa am Institut für Parasitologie.

Herrn Dr. Klaus Failing, Abteilung Biomathematik und Datenverarbeitung (Institut für Veterinär-Physiologie) danke ich sehr für die freundliche Beratung und Hilfe bei der statistischen Datenauswertung.

Frau Dr. Ivonne Stamm und Frau Dr. Silke Lautenschläger danke ich für die Durchführung des Stx2e-Neutralisationstests bzw. der DNS-Sequenzierung.

Frau Anja Schwanitz und Frau Birgit Schmidt danke ich für die Einarbeitung in die verwendeten Methoden und die moralische Unterstützung während meiner Zeit im Labor.

Bei allen nicht genannten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen (auch Doktoranden) des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere bedanke ich mich sehr für die freundliche Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Helge Karch, Institut für Hygiene und Mikrobiologie (Universitätsklinikum Münster) danke ich herzlich für die Anregungen und Korrekturen des Manuskriptes.

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders meiner Ehefrau Paola und meinen Kindern Catalina und Daniel, da sie mich immer mit liebevollem Verständnis unterstützt haben.

Dem Katholischen Akademischen Ausländer-Dienst (KAAD) danke ich für die Gewährung des Doktorandenstipendiums.

ISBN 3-939403-02-9